

植物病原糸状菌*Rhizoctonia solani*の保持するプラスミドにコードされた新規タンパク質に関する解析

著者	佐々木 厚子
学位授与機関	Tohoku University
URL	http://hdl.handle.net/10097/54106

植物病原糸状菌 Rhizoctonia solani の
保持するプラスミドにコードされた
新規タンパク質に関する解析

佐々木 厚子

植物病原糸状菌 *Rhizoctonia solani* の
保持するプラスミドにコードされた
新規タンパク質に関する解析

佐々木 厚子

目次

I 緒言	1
II 既往の研究	6
III 材料及び方法	14
IV 結果及び考察	40
1. 菌糸融合第4群における解析	40
1) 菌体重の経時変化	
2) 相同RNAの検出	
3) ゲノム上における相同配列	
4) モノクローナル抗体の作製と力価	
5) 全タンパク質から相同タンパク質の検出	
6) 培養濾液から相同タンパク質の検出	
7) 細胞分画で得られた画分からの相同タンパク質の検出	
8) 酸-アルカリによる相同タンパク質の選択的可溶化	
9) 糖鎖の付加解析	
10) 2D-PAGEを用いた相同タンパク質の単離	
11) 相同タンパク質のアミノ酸配列と解析	
考察	
2. 菌糸融合第2群における解析	77
1) 菌体重の経時変化	
2) 相同RNAの検出	
3) pRS224のORFにコードされたタンパク質の発現	
4) 発現タンパク質の精製	
5) 抗体作製と力価	
6) 全タンパク質から相同タンパク質の検出	
7) 培養濾液から相同タンパク質の検出	
8) 細胞分画法で得られた画分からの相同タンパク質の検出	
9) 抗RS224-c抗体と検出された相同タンパク質の反応	
考察	
V 総合考察	103
VI 摘要	108
VII 参考文献	111

II 緒言

植物病原体とは植物に寄生し病気を引き起こす生物群の総称であり、その種類は、小さなものではウイロイド・ウイルスなどから、細胞壁を保持したバクテリア・ファイトプラズマ・放線菌などの原核生物、糸状菌・センチュウなどの真核生物までと多岐に渡って存在する。これらが植物に寄生する能力は、植物と共進化によって長い時間をかけて獲得したものであることから、自然界のように多種多様な植物相が混在し、また単一植物が優勢であってもそれらが遺伝的にヘテロガスな集団であるような状況では、ある病原体の爆発的な蔓延は比較的起りにくい。しかし今日人間が営んでいる農業のように、遺伝的に均一な単一植物相を大面積で栽培する場合は、病原体の発生により大凶作となることがある。人間が地球上で生存し続ける限り、食料の多くを農業によって供給し続けなければならない以上、この供給を妨げる最大の要因となりうる植物病原体から農作物を保護し、収量、品質の向上を図ることは、これから益々人口が増加するであろう21世紀に向けて必要不可欠な課題となる。また、近年大きくクローズアップされてきた化学農薬大量散布による環境汚染問題・抵抗性病原体の出現といった観点からも、従来のように化学農薬に多くを依存してきた防除法ではなく、その使用を最小限度に抑えつつも効果的に病原体を抑制できるような、新しい防除法について検討する必要がある。このためにも、植物がどのように病原体に対して抵抗性を示すのか、あるいはどのように病原体がその宿主を認識して感染を成立させるのかといった機構について根本的な解析が必須となる。近年の遺伝学的解析手法の進歩によって、植物が病原体に出会った際にその病原体に対して抵抗性を示す場合、病原体側の非病原性遺伝子 (avr gene) 産物を、植物体側の保持する抵抗性遺伝子 (R gene) 産物によって認識し、その後の防御反応を引き起こすという、遺伝子対遺伝子説 (Flor 1956, 1971) の分子生物学的な証明が次々となされている (Thomas et al. 1994, Tang et al. 1996, Scofield et al. 1996, Cao et al. 1997, Ryals et al. 1997)。これらの知見を総合すると、植物が病原体を認識し、抵抗性反応を示す際には、レセプターに非病原性遺伝子産物が結合し、細胞内シグナル伝達経路が活性化し、それらが幾つかの点に収束した後、最終的には細胞レベルでの抵抗性に関与する遺伝子の発現、ある

いは抵抗性に関与する細胞内機構の活性化を引き起こし、局部抵抗性、さらには全身獲得抵抗性（SAR）の発現へ進むと考えられている。

植物側が病原体を認識し、抵抗性反応を示す際に働くシグナルカスケードの解析は急速に進歩している一方、植物病原体がいかにしてその宿主を認識して感染を成立させるかといったメカニズムの解析は遅れている。特に植物病原糸状菌は真核細胞であるため、ウイルス、バクテリアと比較して生物学的に複雑な仕組みを保持しているため解析が困難である。しかしながら植物病原体の約80%が糸状菌であることから、植物病原糸状菌が病原性を発揮するために必要な遺伝学的背景を解析することは植物を病気から保護する上で、その意義は大きい。

植物病原糸状菌で病原性に関与していると報告された遺伝子には、宿主植物に対する毒素をコードしたもの（Wevels et al. 1991）、毒素生産酵素をコードしたもの（Scott-Craig 1992,）、病原性を示すための形態形成に関与するもの

（Talbot et al. 1996）などがある。これらは核ゲノムにコードされているが、核外遺伝子のウイルス用dsRNAがその病原性に影響を与える例も報告されている

（Nuss, 1996）。また植物病原糸状菌の中には線状または環状のプラスミドを保持するものが幾つか報告されているが、線状のもの多くはミトコンドリア内在性であり、より解析の進んでいる*Neurospora*などで見いだされたミトコンドリア内在性の線状プラスミドと同様、両末端にTIRが存在し、5'末端にタンパク質を結合し、ミトコンドリア内のcodon usageに従ったORFに自己の複製に関与していると推定されるDNAポリメラーゼと、RNAポリメラーゼをコードしているといった共通の特徴が明らかにされている。これらの中でその構造、特にプラスミドにコードされたタンパク質について最も解析が進んでいるのは小麦麦角病原菌である*Claviceps purpurea*の保持するプラスミド、pCLK1である（Oeser et al., 1989）。糸状菌の保持するプラスミドが宿主の表現型に与える影響については、今日まだ明確な回答は得られていないが、*Neurospora intermedia*と*N. classa*の線状DNAプラスミド、kaliloとmaranharはミトコンドリアゲノム内にランダムに挿入されることによって、そこにコードされた遺伝子の発現に支障をきたし、菌体の老化

（senescence）を早めることが知られている（Bertrand et al. 1985, 1986, Court et al. 1991）。植物病原糸状菌が病原性を示すために、dsRNAやプラスミドなどの

核外遺伝子が必須でないにしろ、これらが細胞内に存在することによってその生理的活性が弱まり、ひいてはその病原性の低下をもたらすとすれば、これらは化学農薬にとって変わる次世代の防除法として大いに期待される。その為にも、これら核外遺伝子の構造、特にそこにコードされたタンパク質がどのような機能を有しており、それが宿主である糸状菌あるいはプラスミド自身のためにどのような役割を果たすかについて明確にする必要がある。

*Rhizoctonia solani*は66科230種以上の植物を犯す極めて多犯性の土壌伝染性植物病原糸状菌であり、難防除土壌病害のひとつとされる。本菌は1細胞中に5~13個の核を含み、染色体観察が困難な上、極めて堅牢な細胞壁を保持し、これまで形質転換ベクターが開発されていないため、その遺伝学的解析はほとんど進んでいない。本菌は菌糸融合群（AG）によって類別され、現在までに第10群までが確認されているが（生越, 1976）、この類別が、培養型、宿主範囲などの表現型による類別とも一致することから、これらの形質がどのような遺伝子によって支配されているのか解析することによって、本菌の防除に有効なヒントになりうると考えられる。*R. solani*のAG1からAG6までは各群ごとに特有の大きさと配列のプラスミドを保持しており（Miyasaka et al. 1990）、かつこれらプラスミドからの転写物と推定される相同RNAが検出されたことから（Kuradate et al. 1996）、プラスミドが転写領域にタンパク質をコードしていた場合、菌糸融合群ごとに異なるタンパク質が発現し、これらが宿主である*R. solani*の表現型に何らかの影響を与えている可能性が考えられる。これらプラスミドのうちAG4の保持するpRS64-2と、AG2-2の保持するpRS224-1に関しては全塩基配列が決定されている。どちらのプラスミドも中央領域は2本鎖DNAの線状構造を取っているが、左右両端部は全く相同性がないにも関わらず、1本鎖DNAからなる類似のヘアピンループ構造をとっていると考えられている（Katsura et al. 1997, 桂, 1997）。pRS64とpRS224はどちらも2本鎖領域に機能不明の新規タンパク質RS64とRS224をそれぞれコードしており（Hongo et al. 1994, 桂, 1997）、その領域を含んだ転写RNAと考えられる相同RNAが検出されている。RS64に関してはすでにポリクローナル抗体が作成されて、AG4に属する菌株からプラスミドの有無に関わらず、相同性のあるタンパク質が検出されている（宮坂, 1996）。

本研究では、AG4に属する菌株に関してはゲノム上のpRS64との相同配列と、RS64のコード領域と相同性のあるRNAの経時変化に関して検討を行い、検出された相同タンパク質の由来について検討を行った。また、ウサギ抗体と反応した相同タンパク質について、モノクローナル抗体を作成してRS64との特異性をさらに向上させた上で、その反応に関して検討を行った。さらに、細胞分画法を行って相同タンパク質の所在に関して検討を行うとともに、2D-PAGEで相同タンパク質を単離してアミノ酸シーケンスを行い、相同タンパク質がRS64と類似の配列を保持しているか検討を行った。またAG2-2IVに属する菌株に関しては、タンパク質の発現している可能性について検討するため、ORF領域を含んだ相同RNAの経時変化について検討し、RS224に対する抗体を作成して相同性のあるタンパク質の菌体内での発現について検討するとともに、細胞分画法によって相同タンパク質の所在に関して検討を行った。RS64とRS224は、共に既知のタンパク質と相同性を全く示さず、また相互に相同性がないことから、その機能を推定するために両者に関して比較検討をした。

謝辞

本研究を行うにあたり、東北大学農学部植物病理学講座教授江原淑夫博士、同大学環境適応生物工学講座教授羽柴輝良博士（元植物病理学講座助教授）には終始懇切なる御指導及びご鞭撻、並びに本論文の御校閲を賜りました。同講座現助教授高橋英樹博士、現助手柄澤明博士、長谷修博士、同技官鈴木寿夫氏、伊藤久美子女史には平素から適切な御指導と御助言をいただきました。横浜市立大学教授平野久博士、農林水産省農業生物資源研究所生育遺伝子研究室梶原英之博士にはペプチド合成とタンパク質の解析に関して、東北大学農学部動物生理化学講座技官大友康氏にはウサギポリクローナル抗体作製に関して、東北大学農学部応用微生物学講座教授神尾好是博士にはフレンチプレスの使用に際してご便宜を図っていただきました。東北大学農学部酵素化学研究室教授中島佑博士には細胞分画法に関して、東北大学農学部細胞生化学講座教授山谷知行博士、同講座助手早川俊彦博士には抗体精製と免疫学的手法によるタンパク質の検出に関し多大なる御指導と有意義な御助言をいただきました。東北大学加齢医学研究所癌細胞保存施設工藤俊雄教授にはモノクローナル抗体作製に関して、また同施設職員の方々には施設使用に関して格別のご便宜をはかっていただきました。本講座修了生である宮坂篤氏（現農業研究センター勤務、博士）、本郷正氏（現秋田県職員）、桂幸次氏（現東北大学加齢医学研究所、博士）、倉舘公子女史（現青森県職員）、富士真氏（現全国農業協同組合）また本講座の院生及び学生諸氏には常日頃御協力をいただきました。ここに記して深く感謝の意を表します。

II 既往の研究

近年の遺伝子学的解析技法の発達により、植物側と病原体側の両方で分子生物学的な解析が精力的に行われ、遺伝子対遺伝子説 (Flor 1956, 1971) に基づいた抵抗性反応を証明するような実例が次々と挙げられている。植物側が病原体を認識する分子として、トマト灰色カビ病菌 *Cladosporium fulvum* の AVR9 を認識し抵抗性反応を示すために必要なトマトの Cf-9 遺伝子や (Jones D. A. 1994)、植物病原細菌の *Pseudomonas syringae* の AvrPto を認識し、抵抗性を示すために必須なトマトの抵抗性遺伝子 *pto* (Martin et al. 1993) などが挙げられる。構造解析の結果、cf-9 は、ロイシンリッチリピート (LRR) と膜貫通ドメインを保持したレセプター様のタンパク質をコードしていることが示され、*pto* はセリン・スレオニンカイネースドメインを持ち、実際に avrPto と細胞内で結合したあとに抵抗性に関与するシグナルトランスダクション経路を活性化する可能性が示唆されている (Tang et al. 1996, Scofield et al. 1996)。また、病原体の認識後、細胞内でのシグナル伝達をおこなう分子として、アラビドプシスでは植物病原糸状菌の *Peronospora parasitica* と植物病原細菌の *Pseudomonas syringae* の avr gene 産物からのシグナルが収束すると考えられる *npr1* と *nim1* が挙げられている。*npr1*、*nim1* は近年全塩基配列が決定され、全く同じタンパク質をコードしていることが示された (Cao et al. 1997, Ryals et al. 1997)。このように植物で見いだされている抵抗性反応につながるシグナル伝達に関与している分子は、動物で見いだされたものと構造上の共通性が多く、両者の間で保存されたシグナル伝達経路が存在している可能性が示唆されている。近年得られた知見を総合すると、植物が病原体を認識し、抵抗性反応を示すには、レセプターに非病原性遺伝子産物が結合し、細胞内シグナル伝達経路が活性化し、それらが幾つかの点に収束した後、最終的には細胞レベルでの抵抗性に関与する遺伝子の発現、あるいは抵抗性に関与する細胞内機構の活性化が引き起こされ、局部抵抗性さらには全身獲得抵抗性 (SAR) の発現へと進むと考えられる。

植物側が病原体を認識し、抵抗性反応へと続くシグナルカスケードの解析と比較した場合、植物病原体がいかにしてその宿主を認識して感染を成立させるかという点に関しての解析は遅れている。特に植物病原糸状菌に関しては、植物病原体の 80%

を占めていることから、植物病原糸状菌が病原性を発揮するために必要な遺伝学的背景を解析することは植物を病気から保護する上で、その意義は大きいと思われる。近年になって形質転換ベクターの開発された *Ustilago maydis* (Wang et al. 1988)、*Magnaporthe grisea* (Leung et al. 1990)、*Criponectria parasitica* (Churchill et al. 1990)、*C. fulvum* (Oliver et al. 1987)、*Rhynchosporium secalis* (Rohe et al. 1995, 1996)、*Phytophthora infestans* (Judelson et al. 1991) などはその病原性発現機構に関与する遺伝子の解析が急速に押し進められている。*M. grisea* が植物表面を認識し、感染のために必須な付着器を形成する際、疎水性の低分子量タンパク質であるハイドロフォビンが何らかの重要な機能を担っていることが示唆されている (Talbot et al. 1996)。認識後の形態変化に関する遺伝子の発現には、植物が avr gene 産物を認識した後に各種抵抗性反応を引き起こすのと同様、Gタンパク質 (Liu et al. 1997)、cAMP依存型プロテインカイネース (A-kinase) が活性化され、その後の各種リン酸化経路を活性化することによって進行すると考えられている (Choi et al. 1997, Adach et al. 1998)。病原性に関与する遺伝子としては、このような表面認識後の付着器形成のためのシグナル活性経路だけでなく、細胞外に分泌して積極的に宿主に感染するための毒素生産に関与する遺伝子 (Scott-Craig et al. 1992)、宿主の産生する抗菌性二次代謝物分解酵素 (Osbourn et al. 1995)、宿主細胞壁分解酵素、あるいは逆に宿主に過敏反応を引き起こす avr gene についても幾つかクローニングされている。*R. secalis* の非病原遺伝子である *nip1* は宿主非特異的毒素としての活性も保持していることが近年明らかになり (Rohe et al. 1995)、遺伝子対遺伝子説における謎のひとつ、なぜ病原体が avr gene 産物のような、自己の不利益になるようなものを産生するかについての1つの回答が示された。これらの病原性に関与していると報告された遺伝子は核ゲノムにコードされたものであるが、核外遺伝子とその病原性に影響を与える例も報告されている。*C. parasitica* において、ウイルス様2本鎖RNA (hypovirus) が菌体内にある場合、コロニー形態が変化し、色素合成や分生子形成能・病原性に著しい低下を引き起こすが (Nuss, 1996)、これは hypovirus が存在することによって、Gi サブクラス α サブユニット量が減少し、外界からのシグナルを的確に伝達できず、遺伝子の転写調節がうまく行えないためと考えられている (Chen et al.

1996)。

植物病原糸状菌の中には、染色体外の自律増殖因子としてプラスミドを保持するものが幾つか報告されている。一般的に菌類では線状と環状の2種類のプラスミドが見いだされているが、線状プラスミドの方が多く報告されている。線状プラスミドは末端構造によって、5'末端にタンパク質を結合しているもの、ヘアピン・ループ構造を取るもの、末端にtandem配列を取るものに大きく分けられ、これら末端構造がプラスミドの複製の際に重要な機能を果たすと考えられている。これまで菌類で報告されたプラスミドのうち、所在が明らかになったものについては、*Kluyveromyces lactis*にキラー形質を与える細胞質内在性プラスミドのpGLK1、pGLK2を除いて (Stam et al., 1986)、線状、環状共にミトコンドリア内に存在している。植物病原糸状菌に関しては、*Ceratocystis fimbriata* (Giasson L. et al. 1987, Normand et al. 1987)、*Claviceps purpurea* (Tudzynski et al. 1983)、*Tilletia controversa* (Kim et al. 1988)、*Cochliobolus heterostrophus* (Garber et al.)、*Fusarium oxysporum* (Kistler et al. 1986, Hirota et al. 1992)、*F. sporotrichoides* (Cullen et al. 1985)、*Nectria haematococca* (*F. solani* f. sp. *cucurbitae*) (Smac et al. 1988)、そして *Glomerella musae* (Freeman et al. 1997) などから5'末結合タンパク (TP) が結合したミトコンドリア内在性線状プラスミドが、さらに *Alternaria alternata* からはミトコンドリア内在性の環状プラスミドが見いだされている (Kaneko et al. 1997)。菌類で見いだされたほとんどのプラスミドは、線状・環状ともに自己の複製に機能すると推定されているDNAポリメラーゼやRNAポリメラーゼをコードしている。興味深いことに、ミトコンドリア内在性プラスミドのORFを推定する場合、線状のものも環状のものもミトコンドリアのみで有効なcodon usage (Fox 1987) に従わないと、有効な配列が見いだせないことがある (Osser et al. 1989, Chan et al. 1991, Osiewacz et al. 1984)。上述の植物病原糸状菌で見いだされた線状プラスミドのうち、特に小麦麦角病原菌の *C. purpurea* の保持するプラスミド、pCLK1に関してはコードされたタンパク質とその菌体内での発現について解析が進んでいる。pCLK1は大きさ6.7kbで、両末端にterminal inverted repeat (TIR) 領域を持つ典型的なミトコンドリア内在性線状プラスミドの特徴を示す。pCLK1からは3.5kbと3.7kbの転写RNAが見いだされ

(Duvell et al., 1988)、mitochondrial usage codonに従って ORFの検討を行ったところ、この転写RNAに合致する大きな ORFが2つと、このORFの中に含まれる形で小さな ORFが4つ予想された (Oeser and Tudzynski, 1989)。メジャーな ORFはどちらもTIR領域に開始部位があり、長い方のORF1は末端結合タンパク質をプライマーとするウイルス様のClass B DNA polymeraseと相同性を示した。また DNAポリメラーゼのN末側には機能不明のアミノ酸配列があり、この領域にはアデノウイルスやファージの末端タンパク質様の、タンパク質プライミングによるDNA合成開始に重要なアミノ酸配列が若干保存されていた。このことから、TPはDNAポリメラーゼ前駆体タンパク質からN末側がスプライシングされて作られると考えられている。短い方のORF2はRNAポリメラーゼとして機能するための保存ドメインを持っており、バクテリオファージや酵母ミトコンドリア由来のRNAポリメラーゼと相同性を示したことから、RNAポリメラーゼをコードしていると予想された。これらタンパク質に対する抗体を作製して、菌体内での発現について検討したところ、プラスミドを保持している菌株のミトコンドリア画分から、プラスミドがコードしているタンパク質の予想分子量と一致した大きさのタンパク質が反応した (Gessner-Ulrich et al. 1992)。

植物病原糸状菌で見いだされたミトコンドリア内在性線状プラスミドが、宿主の表現型に与える影響に関してはあまり明らかにされていない。植物病原糸状菌に関しては、*F. oxysporum*の5つの分化型 (*conglutitans*, *raphani*, *matthiori*, *lini*, *arctii*) において、これらが保持するプラスミドと分化型の間に相関性がある (Kistler et al. 1986, 1987, Hirota et al. 1992)、*C. purpurea*において病原性を示すためのライフサイクルにプラスミドが関与している可能性が示唆されている (Gessner-Ulrich et al. 1994) といったわずかな知見が得られている程度である。一方、*N. intermedia*と*N. classa*の保持するプラスミド *kalio*と*maranhar*、*P. anserina*の保持する *pAL2-1*はミトコンドリア内に独立して存在しても宿主にはなんら影響を与えないが、プラスミドがミトコンドリアゲノムに組み込まれた場合のみ、前者2つはsenescence、後者はlongevityを引き起こすことが知られている (Bertrand et al. 1985, 1986, Court et al. 1991)。しかし、このようなミトコンドリアゲノムへの完全長のプラスミドのインテグレーションは植物病原糸状菌のプ

ラスミドでは見いだされていない。

*R. solani*は極めて多犯性の植物病原糸状菌であり、菌株によって宿主植物、培養型、菌核形成などにさまざまな表現型を示す。これらの性質を系統立てて分類するために、本菌の種内類別はこれまでに表現型の差異や、菌糸融合の有無に基づいて試みられている。菌糸融合による類別はこれまでAG1からAG10まで10種の菌糸融合群が知られており（生越 1976）、*M. grisea*の1-1と1-2（Kang et al. 1994）、あるいは*Saccharomyces cerevisiae*の α とa（Cappellaro et al. 1994）のように2つの接合型によって支配されている場合と比べ、菌糸融合群の認識に關与する遺伝的背景は複雑であることが考えられる。また菌糸融合による類別は、培養型あるいは宿主範囲による類別とも共通点が多く、このような表現型を支配する遺伝子は同じAG内で共通であると予想される。

近年の解析技術の進歩により*R. solani*においても少しづつではあるが遺伝子解析が進んでいる。本菌が植物に感染する際に、宿主細胞壁中のフェノール性物質を酸化し解毒するための酵素であるラッカーゼ遺伝子の4つのisoformがクローニングされている（Waheleithner et al. 1996）。また分類においてはrDNAのinternal transcribed spacer (ITS) region領域の多型が、AGによる分類、あるいはsubgroupにおける分類と一致することから（Kuninaga et al. 1997）、新たな遺伝的分類の指標として利用し得ることが示されている。*R. solani*は核外遺伝子としてdsRNAを保持している場合があるが、これが病原性の低下を引き起こすという報告と（Castanho et al. 1978, Jian et al. 1997）、増加に關与するという報告

（Finkler et al. 1985）、あるいは全く關与していないとの報告もある（Kousik et al. 1994）。近年、AG3の保持する病原性上昇に關与するdsRNAは植物のBromovirusに属するdsRNAの複製酵素と（Jian et al. 1997, 1998）、低下には*C. parasitica*にhypovirulenceを引き起こすdsRNAの複製酵素と相同性を示すタンパク質がコードされていることが（Lakshman et al. 1998）示されている。

*R. solani*は繰り返し土壌に接種することによって著しい病原性の低下を引き起こす。これは衰退現象といわれ、この性質がどのような原因によって引き起こされるのかを解明するため、百町らはAG4に属し、ダイコンの苗立枯病を引き起こす1271菌株が衰退現象を引き起こした土壌からRI-64菌株を再分離した。RI-64菌株は元株

である1271菌株と比較すると、病原性、菌核形成能力が著しく低下し、生育速度が極めて遅く、シュウ酸を多量に生成し、菌体内にプラスミドを保持していることが見いだされた（百町ら 1983a, 1983b, hyakumachi et al. 1984, Hashiba et al. 1984）。これら表現型の変化が、プラスミドを保持することに起因するものなのかどうか検討するために、Shimma et al. (1988) はRI-64菌株から調製したプロトプラストを再び菌糸に再生させ、シュウ酸を生産せず、菌核形成能力を回復した5菌株を得、プラスミドの検出を試みたところ、これら5菌株はいずれもプラスミドを保持していたことから、プラスミドはシュウ酸生成、菌核形成という表現型には関与していないことを示した。また、RI-64菌株は自身の産生するシュウ酸によって、生育阻害を引き起こしていると考えられた。

Miyasaka et al. (1990) はプラスミドが*R. solani*の表現型に与える影響についてより広範囲に渡って検討を行うためにAG1からAG6に属する菌株に関して、プラスミドの有無の検討を行った。この結果、供試したAG1からAG6の各群からプラスミドを保持しているものが見いだされた。これらプラスミドは2.2kb～8.0kbと多岐に渡っていたが、菌糸融合群ごとに異なる大きさであり、さらにその配列は各菌糸融合群間で相同性がないことが示された。

Chin et al. (1989) はRI-64菌株から細胞分画法によってミトコンドリア画分を得、この画分にpRS64が存在すること、さらにこの画分をDNaseIで処理してもpRS64が失われないことから、本プラスミドがミトコンドリア内在性である可能性を示した。

Miyashita et al. (1990) はAG4の保持するプラスミド、pRS64の構造について解析を試み、pRS64は3'-5'エキソヌクレアーゼ、5'-3'エキソヌクレアーゼの両者に対して耐性であったこと、アルカリアガロースゲル電気泳動によって見かけの分子量が2倍になることを示した。さらにMiyasaka et al. (1990) は非変性条件下とアルカリ変性条件下でpRS64の電顕観察を行い、本プラスミドが非変性条件下では線状であるが、変性条件下では環状となることから、両末端がヘアピンループ構造でつながった2本鎖DNA線状プラスミドである可能性を示唆した。さらにKatsura et al. (1997) はpRS64の両末端領域のシーケンス解析を行って、本プラスミドの両末端は1本鎖DNAであることを明らかにし、左右両末端はまったく相同性がないにも

関わらず、十字型が組みあわさった類似の2次構造をとると予想した。また桂

(1997) によってAG2-2培養型IVの保持するプラスミド、pRS224の両末端領域に関しても検討が行われたが、この場合も両末端は相同性がみられなかったが、類似の2次構造をとることが示された。さらに Jabaji-Hare et al. (1994) によってAG5の保持するプラスミドも両末端が一本鎖DNAによって knob structureをとることが示され、*R. solani*の保持するプラスミドは異なるAG間においても、両末端がヘアピンループ構造でつながった特徴的な構造をとることが考えられた。

Hongo et al. (1994) はpRS64の2本鎖領域のシーケンス解析を行い、pRS64-1、-2、-3のそれぞれに既知のタンパク質と全く相同性を示さない約7kDaのタンパク質をコードしたORFの存在を示唆した。また本領域を含んだ形で約0.5kbのpolyA RNAの転写が見いだされたことから、抗体を作製してタンパク質が翻訳されているか検討したところ、RI-64菌株から12kDaの抗体と反応するタンパク質を見いだした。しかしながらこの抗体と反応するタンパク質は、プラスミドを保持していない1271菌株からも検出された(宮坂 1996)。pRS64と相同な配列は、1271菌株のゲノムにも存在している可能性が示唆されることから(Wako et al. (1991)、小林(1991))、AG4において検出された相同タンパク質はゲノム由来である可能性も考えられる。

Kuradate et al. (1996) はAG1からAG6に属する菌株を供試し、他のAGの保持するプラスミドからもRNAが転写されているかについて検討した。この結果、各AGともプラスミドを保持した菌株は自身のプラスミドをプローブとした場合のみハイブリダイズするRNAが検出されたことから、AG1~AG6の保持するプラスミドからはすべてRNAが転写されている可能性を示した。このことから、この領域にORFが存在していれば、それぞれ、特有のタンパク質が発現している可能性が考えられた。

さらに、桂(1997) はAG2-2IVの保持するプラスミドpRS224について構造解析を行ったところ、2本鎖領域に既知のタンパク質と相同性がみられない約105kDaのタンパク質をコードしていることを示し、この領域を含む7.4kbと4.7kbの相同RNAが転写されていることを示した。7.4kbの転写RNAはプラスミドの左側鎖から左側ヘアピンループ、+鎖、右側ヘアピンループ、右側鎖へと転写され、4.7kbのRNA

はプラスミドの+鎖から右側ヘアピンループを介して右側-鎖へ転写が進行する可能性を示唆している。

以上のように*R. solani*の保持するプラスミドは他の糸状菌で見いだされたミトコンドリア内在性プラスミドと比較してその構造がユニークであり、RNAの転写様式も他に類をみない特有の形態をとっている。さらに、ほとんどのプラスミドは自身の複製に関与すると推定される酵素を自身のゲノム中にコードしているのに対し、*R. solani*の保持するプラスミドはこれらの酵素をコードしておらず、代わりに機能の全く分からない新規タンパク質をコードしている。*R. solani*の保持するプラスミドの機能については現在のところ明らかにされていないが、これらが菌糸融合群ごとに特有の大きさと配列をとっており、且つ、それぞれのプラスミドから相同RNAが転写されていることから、ここにコードされた新規タンパク質が宿主の表現型に関して何らかの影響を与えている可能性が示唆される。*R. solani*の保持するプラスミドの機能について明らかにされれば、プラスミドの構造、転写形式が特徴的であることから、防除上の意義だけでなく、生物学的な意義についても大いに貢献すると思われる。

Ⅲ材料及び方法

1. 供試菌株

本研究では*Rhizoctonia solani* Kühn の菌糸融合群 (AG) 第4群に属する菌株は1271、RI-64、R101、GM-11の4菌株を、AG2 に属する菌株はH-16、BV-4の2菌株を供試した。供試菌株の菌叢の様子はFig. 1とFig. 2に示した。遺伝子のクローニング及びシーケンスには大腸菌NM522菌株を、タンパク質の発現には大腸菌BL21(DE3)を供試した。

2. 菌体の保存及び培養

供試菌株はPSA斜面培地 (ジャガイモ200g、ショ糖20g、寒天20g、脱塩水1ℓ) に接種し、27℃で培養・保存をした。DNA、RNA、タンパク質を抽出するための菌体は斜面培地上で生育させた菌体をかきとり、PD液体培地 (Potato Dextrose Broth DIFCO) 24g、蒸留水1ℓ) に接種して27℃で5日間前培養を行った。前培養した菌体はPD培地中でホモジナイザー (AM-6) によって破碎して、PPD培地 (Potato Dextrose Broth 24g、Polypepton 10g、蒸留水1ℓ) に接種し、27℃で静置培養した。PPD培地上で生育させた菌体は脱塩水で洗浄後、ペーパータオルで水分を除き、直ちに使用しない場合は-80℃で凍結保存した。

3. 菌体からのRNAの抽出

RNAの抽出はChomczynski et al. (1982) の方法を一部改変した方法で行った。凍結菌体は予め液体窒素で冷却しておいた乳鉢に移して、液体窒素中で微粉末状に破碎し、菌体1gあたりGuSCN/NCS溶液 (4M グアニジウムイソチオシアン塩、25mM クエン酸ナトリウム、0.5% N-ラウロリルサルコシルナトリウム、0.1% メルカプトエタノール、50mM EDTA) に懸濁した。これに1mlの2M酢酸ナトリウム、10mlの水飽和フェノール、2mlのクロロホルム-イソアミルアルコール (49:1) を加え、激しく振とうして4℃、8000×gで20分間遠心した。得られた上

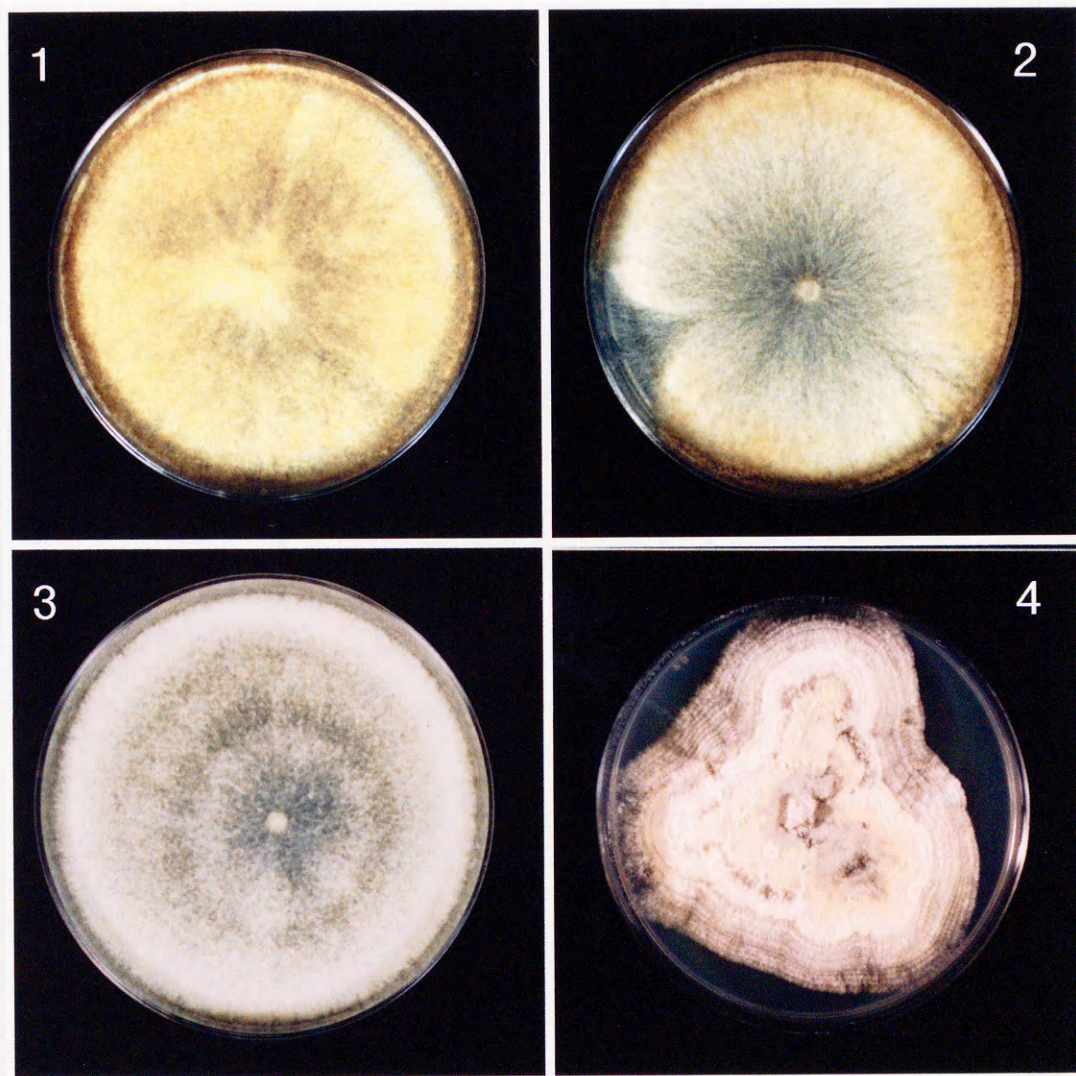


Fig. 1. Mycelial colony of *R. solani* AG4.
1, 1271; 2, R101; 3, GM-11; 4, RI-64.

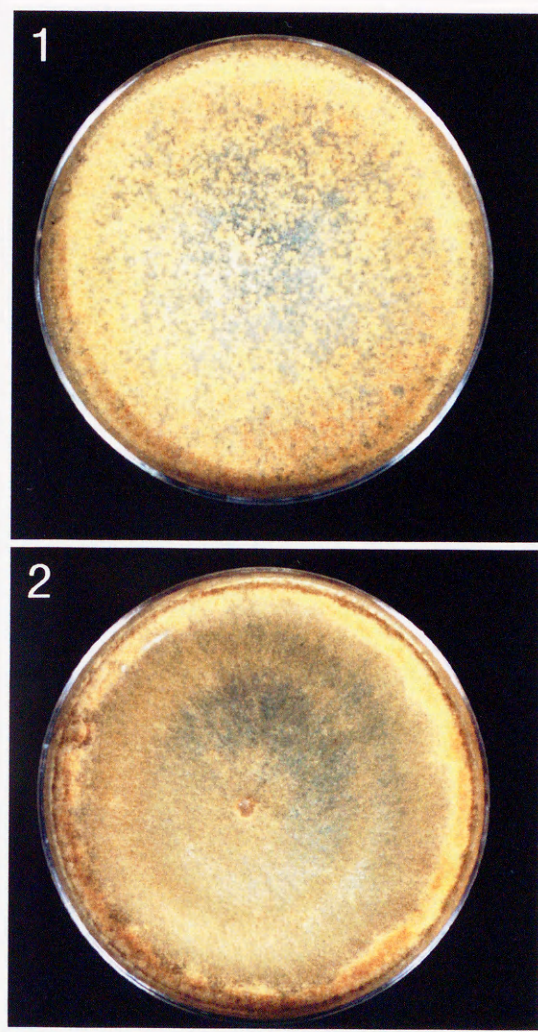


Fig. 2. Mycelial colony of *R. solani* AG2-2.
1, BV-3; 2, H-16.

清4mlに等量のイソプロパノールを加え、 -20°C に1時間静置後、 4°C 、 $8000\times g$ で20分間遠心した。得られた沈澱は4M塩化リチウムに懸濁し、氷上で1時間静置後、 $8000\times g$ で20分間遠心した。得られた沈澱は再び6mlのGuSCN/NCS溶液に懸濁し、 60°C で2分間加熱後、エッペンドルフチューブに移し、等量のイソプロパノールを加えて、 -20°C で45分間静置した。これを $10000\times g$ で20分間遠心後、沈澱を70%エタノールで洗浄し、風乾し、 $400\mu\text{l}$ の蒸留水に懸濁してtotal RNA試料とした。

4. RNAの電気泳動及び染色

RNAの変性及び電気泳動は、Macster et al.(1977)の方法に従って行った。RNA $20\mu\text{g}$ は $24\mu\text{l}$ の1M脱イオングリオキサル、 $1\times\text{TAE}$ (120mM Tris-HCl pH7.0、 0.6M 酢酸ナトリウム、 3mM EDTA)、50%ジメチルスルフォキシド中で 50°C 、1時間加温し、急冷後、Dye (50%グリセロール、 $1\times\text{TAE}$ 、0.04%ブロモフェノールブルー、0.04%キシレンシアノール)を $6\mu\text{l}$ 加えて泳動用サンプルとし、1.2%アガロースゲル/TAEバッファー中で定電圧100Vで約1時間電気泳動を行った。泳動後のゲルは 50mM 水酸化ナトリウム中で1時間振とうしてグリオキサルを除去し、 20mM 酢酸ナトリウム中で15分ずつ2回振とうして中和し、エチジウムブロマイドによって染色後、UVトランスイルミネーターでゲルを観察した。

5. ノザン解析用プローブの調製

プローブは既にクローニングされた遺伝子 (Hongo et al. 1994, 桂 1997) をもとにしてPCRによってDIG標識プローブを調製した。 $20\sim 100\text{pg}$ のDNA溶液に $5\mu\text{l}$ の $10\times\text{PCR}$ バッファー、 $5\mu\text{l}$ のPCR labeling mixture、 $2.5\mu\text{l}$ ずつのM13-21プライマー、M13リバースプライマー、 $4\mu\text{l}$ の 5mM 塩化マグネシウム (全てBoehringer Mannheim)、 $0.5\mu\text{l}$ のTaq-DNA polymerase(G) (Takara)を加え、全量を $50\mu\text{l}$ とした後、 95°C で45分、 45°C で1分、 72°C で1分を30サイクル繰り返した。得られたPCR産物は、エタノール沈澱後、 $100\mu\text{l}$ の蒸留水に懸濁し、DIG標識プロー

ブとして使用した。

6. ノザンハイブリダイゼーション

ノザンブロットは常法に従ってキャピラリーブロットイングによって約24時間、泳動後のゲルからニトロセルロースメンブレン (HybondTMN Amersiam) に転写した。ブロット後のメンブレンは50mM水酸化ナトリウム中で15秒間振とうしてグリオキサールを除去し、1×SSC (333mM NaCl, 333mM酢酸ナトリウム)、0.2M Tris-HCl pH7.5中で30秒間中和し、風乾後、UVクロスリンカー (CL-1000 ultra-bioletcrosslinker フナコシ) を用いて固定した。固定後のメンブレンはプレハイ液 (5×SSC、10×Denhardts、10mMリン酸水素2ナトリウム、0.5%SDS、48%ホルムアミド)中、50℃で24時間振とうした後、ハイブリ液 (Ⅲ-5.で調製したプローブを100℃で10min加熱後急冷して変性させ、プレハイ液で5μl/mlとなるように希釈したもの) を加え、50℃で振とうしながら24時間ハイブリダイゼーションを行った。プローブ処理後のメンブレンは、2×SSC-1%SDS中で室温で10分間×2回洗浄後、2×SSC-0.1%SDS中で65℃15分間×2回洗浄し、ハイブリダイズしなかったプローブを除いた。

7.DIG systemによる検出

検出は全て室温で行った。プローブを処理したメンブレンは、DIG1バッファー (0.1MTris-HCl pH7.6、0.15MNaCl、0.05%アジ化ナトリウム) で5分×2回振とう後、DIG2バッファー (0.1% blocking reagent (Boehringer Mennheim)を含むDIG1バッファー) 中で30分間振とうし、DIG2バッファーで10,000倍希釈したDIG認識抗体 (Boehringer Mennheim)を加え、1時間振とうした。抗体処理後のメンブレンは、DIG1バッファーで15分間×2回洗浄後、DIG3バッファー(0.1MTris-HCl pH9.6、0.1MNaCl、50mM MgCl₂) 中で5分間振とうし、DIG3バッファーで500倍に希釈したCPD-Star (Boehringer Mennheim)を加えて10分間暗黒化で処理した後、X線フィルムに感光させてバンドの検出を行った。

8. 菌体からのDNAの抽出 (桂 1997 から引用)

1〜2週間培養した凍結保存菌体は、凍結真空乾燥機 (Virtis) で完全に乾燥させた。この凍結乾燥菌体からHirtの方法 (Hirt 1967) を一部改変してDNAの抽出を行った。凍結乾燥菌体1gあたり16mlのリン酸クエン酸バッファー (0.1Mリン酸-クエン酸バッファーpH6.0、0.01M EDTA) に懸濁し、10% SDSを2ml加えて、氷中に15分間静置した。この懸濁液を4℃、10,000rpmで40分間遠心し、上清画分を得、ここに0.6倍量のイソプロパノールを加え、混合後室温にて15分間静置し、20℃、10,000rpmで20分間遠心し、沈澱として粗DNAを得た。

粗DNAは、塩化セシウム-エチジウムブロマイド密度勾配遠心によって精製を行った。TE-サルコシルバッファー (20mM Tris-HCl pH8.0、0.25mM EDTA、0.4% N-ラウロリルサルコシルナトリウムpH8.0) を4ml加え溶解し、4gの塩化セシウム及び400 μ gのエチジウムブロマイド (10mg/ml) を加え、20℃、50,000rpmで24時間遠心して、DNAのバンドを得た。DNAのバンドを回収して、1-ブタノール抽出を3回行ってエチジウムブロマイドを除去し、常法に従ってエタノール沈殿を行いTotal DNAを得た。

9. プラスミドDNAの精製 (桂 1997から引用)

Total DNAをTEバッファー (10mM Tris-HCl pH8.0、1mM EDTA pH8.0) で4℃下で一晩放置して十分に溶解させ、大型のアガロースゲル電気泳動装置を用いて、電気泳動し、検出したプラスミドのバンドをゲルごと切り出し、エレクトロエリユーション法 (Maniatis et al. 1989) によりゲルから回収した後、常法によってフェノール・クロロホルム処理、エチルエーテル処理、エタノール沈殿を行い、プラスミドDNAを精製した。

10. Total DNA の制限酵素処理と電気泳動

抽出したTotal DNAはそれぞれ制限酵素とその至適バッファーで37℃で3時間以上消化して、1%アガロースゲル/TEバッファーで電気泳動をした。泳動後のゲルは

エチジウムブロマイドで染色し、UVトランスイルミネーターで観察した。

11. RI標識プローブの調製

アイソトープを用いたDNAの標識は、DNA鎖全体を標識するマルチプライム法 (Feinberg and Vogelstein, 1983) により行った。DNA断片はメガプライムDNAラベリングシステム (Amersham) により標識した。DNA溶液にプライマーを加え、5分間沸騰水で加熱して室温に放置し、リアクションバッファー・ $[\alpha^{32}\text{P}]$ dCTP・酵素液を加えて37℃で10分間インキュベートした。これを沸騰水中で5分間加熱し、氷中で急冷後ハイブリダイゼーションに用いた。

12. サザンハイブリダイゼーション

サザンブロッキングはSothornらの方法をもとに行った。電気泳動後のゲルは0.25M HClでゲルを15分間振とうして脱プリン処理後、蒸留水ですすぎ、0.4M NaOH、0.6M NaClでゲルを30分間振とうしてアルカリ変性し、再び蒸留水で洗浄後、0.5M Tris-HCl pH7.5、1.5M NaClで中和した。中和したゲルは常法に従って、HybondTMにキャピラリーブロッキングによってトランスファーした。DNAをトランスファーしたメンブレンはプレハイ液 (6×SSC、5×Denhardt's、0.5% SDS、100 $\mu\text{g/ml}$ 変性ニシン精子DNA、25%ホルムアミド) に浸せきし、42℃で一晩振とう後、³²Pラベルプローブを含むプレハイ液中で42℃で一晩浸透した。洗浄は2×SSC-0.5% SDSにより42℃で15分間、1×SSC-0.1% SDSにより室温で30分間2回、0.1×SSC-0.1% SDSにより42℃で1時間振とうしながら行った。サーベイメーターで十分洗浄されているかバックグラウンドを確認後、X線フィルムに感光させて、相同領域の検出を行った。

13. 遺伝子のクローニングと大腸菌の形質転換

1) PCRによる挿入断片の増幅とベクターの構築

精製したプラスミドDNA50pgをテンプレートにして、*Bam*HIサイトを付加させた合成プライマー（オリゴサービス）を用いて、95℃で1分、63℃で2分、72℃で3分のPCR反応を30サイクル行って、増幅断片を得た。増幅断片は*Bam*HIで3時間以上処理した後、フェノール・クロロホルム処理、クロロホルム処理を行って、エタノール沈澱を行い、これをクローニングベクターpUC19/*Bam*HI/CIPP（Takara）にTakara Ligation Highキット（Takara）を用いて16℃、30分以上反応させてライゲーション反応を行った。

2) 遺伝子のクローニングと大腸菌への形質転換

遺伝子のクローニングはHanahanの方法（Hanahan 1983）をもとに行った。大腸菌NM522菌株コンピテントセル100 μ lにライゲーション反応後のベクターを加え、30min氷上に静置し、42℃で45秒ヒートショックを与え、氷上に戻し急冷し、SOC培地

（2%バクトトリプトン、0.5%酵母抽出液、20mM MgSO_4 、20mM グルコース）を0.9 μ l加えて37℃で1時間振とう培養を行った。培養液はアンピシリン添加LB寒天培地（1%バクトトリプトン、0.5%酵母抽出液、1% NaCl、1.5%寒天中に50 μ g/ μ lの濃度でアンピシリンを含む）に接種し、37℃で一晩培養後、出現したコロニーをアンピシリン添加LB液体培地に接種し、6時間以上培養した。

14. プラスミドDNAの迅速単離

培養した大腸菌は5,000rpmで5分間遠心して集菌し、培地を除き、Solution1（25mM Tris-HCl pH8.0、10mM EDTA、50mMグルコース）を110 μ l加えて懸濁して室温で5分放置し、Solution2（0.2M NaOH、1% SDS）を220 μ l加えて氷上に5分静置し、Solution3（3M CH_3COOK 、11.5% CH_3COOH ）を160 μ l加え、常法に従ってフェノール・クロロホルム処理後、エタノール沈澱を行い、得られた沈澱にRNase処理を行った。得られたクローンを *Bam*HIで切断し0.7%アガロース/TAEバッファー（40mM Tris-HCL、40mM CH_3COONa 、1mM EDTA）で泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色後、UVトランスイルミネーターで観察して、

目的の大きさのインサートを含むクローンをその後の実験に供試した。

15. シークエンスによるインサートの確認

得られたクローンは、常法によってPEG沈殿後、ダイデオキシ法によるシークエンスによって挿入部位の塩基配列の確認を行った。0.1 μ gのインサートDNAを含むクローンにThermo Sequence dye-Terminator Cycle Sequencing pre-mix Kit (Amersham)と、M4またはM4 revプライマーを10 μ Mを加え、全量を10 μ lとし、96°Cで30分、50°Cで15分、60°Cで4分のPCR反応を25サイクル行った。反応後のエタノール沈殿は常法の容量で氷上に15分静置して行った。得られた沈殿は4 μ lのサンプルバッファー (50mM EDTA : 脱イオン化ホルムアミド=1 : 5) に溶解し、100°Cで10分加熱後氷上で急冷して泳動試料とした。泳動はポリアクリルアミドゲル (6%アクリルアミド、50%尿素を含む1× TBE (89mM Tris、89mM ホウ酸、2mM EDTA)) によって行い、泳動後のデータ解析はMacintosh Model 373Aソフトウェアによって行った。

16. タンパク質発現ベクターの構築

確認したインサートは、*Bam*HIで切断後、0.7%アガロース/TAEバッファーで泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色後、UVトランスイルミネーターで観察して、目的の大きさのインサートを切り出し、Prep-A-gene DNA purification system (Bio Rad) で精製した。これを発現ベクターpGX-2T (Pharmacia) にライゲーション後、大腸菌NM522に形質転換し、T7プロモーターを用いたシークエンスによりインサートの確認を行った。

17. タンパク質の発現

タンパク質発現ベクターはタンパク質発現用の大腸菌BL21(DE3) (Novagen) に形質転換した。形質転換した大腸菌は100 μ g/mlアンピシリン添加LB液体培地で前

培養を1晩行った後、アンピシリン添加LB液体培地で1/10に希釈して、吸光度 (AD600) が0.8になるまで37℃で約3時間培養した。タンパク質発現の誘導は IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) を最終濃度25mg/mlになるように添加して行った。誘導後の大腸菌は37℃で5時間振とう培養を行ってタンパク質を発現させた。

18. 大腸菌の破碎と発現タンパク質の可溶化

タンパク質を発現させた大腸菌は5,000rpmで5分間遠心して集菌後、破碎バッファー (50mM Tris-HCl pH8.0、2mM EDTA) で洗浄し、再び菌の体積の約10倍量の破碎バッファーに懸濁した。100 μ g/ μ lとなるようにLysozymeを添加し、さらに0.5%となるようにTriton X-100を添加して30℃で15分間インキュベーションした。これを氷上で十分冷却し、超音波破碎機 (TOMY) を最大出力にセットし5~10秒 \times 10回破碎し、大腸菌が十分破碎されたのを確認後、4℃で12,000rpmで15分間遠心後、沈澱画分を得た。沈澱画分は1% Triton X-100を含むPBSバッファーで2回洗浄後、PBSバッファーに懸濁し、等量の2 \times サンプルバッファーに懸濁して可溶化した。

19. マウスによるポリクロナール抗体の作製

1) マウスへの免疫

純化したタンパク質は、PBS (pH7.2)に0.1mg/mlとなるように溶解したものを200 μ lと等量のIncompletely adjuvanted (FICA) をトップ三方活栓で結合した1mlシリンジで均一なエマルジョンになるまで混合し、マウス系統Balb/cCr (♀)の背部に7~10日おきに皮下注射して免疫を行った。部分採血によって力価の上昇を確認後、同様に調製したエマルジョンをマウス腹腔内に注射して3日後、全採血を行った。

2) 部分採血

免疫を3回あるいは6回繰り返した後、抗体力価の上昇を確認するために部分採血を行った。採血はマウス尾部付け根をメスで切開し、約200 μ l採血した。採血後の血液は、室温で3時間静置後、3,000rpmで5分間遠心し、血清部を回収してアジ化ナトリウムを最終濃度0.1%となるように加え、4℃で保存した。

3) 全採血

腹腔注射後のマウスは、解剖し、心臓から直接全採血を行った。採血後の血液は、室温で3時間静置後、3,000rpmで5分間遠心し、血清部を回収してアジ化ナトリウムを最終濃度0.1%となるように加え、4℃で保存した。

20. マウスによるモノクローナル抗体の作製

モノクローナル抗体の作製はKudo et al. (1987) の方法に従って行った。

1) ミエローマ細胞の培養及び経代

細胞凍結保存液セルバンカー（メチルセルロースcp4000 0.1g、RPM1-1640 1.02g、DMSO 10ml、10%NaHCO₃ 0.8ml、MilliQ水 100ml）で凍結保存しておいたBALB/c由来マウスミエローマ細胞のP3X63Ag8-653 (hypoxanthineguaninephosphoribosyl transferase (HGPRT) 欠損) をすばやく37℃のインキュベーターで解凍し、3,000rpmで12分間遠心し、細胞を沈殿させ、その後、セルバンカーを吸引した。この沈殿にGIT培地（和光純薬）を加えて懸濁し、CO₂インキュベーター（5%CO₂、37℃）で3～4日おきに経代培養を行った。経代培養の際には、細胞数を血球計算盤を用いて計測し、新しいGIT培地で細胞数が $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$ となるように希釈したものを引き続きCO₂インキュベーターで培養した。

2) マウスへの免疫

マウスはBALB/cを供試し、マウスへの免疫はポリクローナル抗体の作製と同様に行った。

3) 部分採血

免疫途中の抗体力価について検討を行うため、マウスの眼にパスツールピペットを差し込んで300~400 μ lの血液の部分採血を行った。得られた血液はポリクロナル抗体の作製の時と同様の操作で血清を得て、0.1%となるようにアジ化ナトリウムを添加し4℃で保存した。

4) 細胞融合

最終免疫から3~4日後のマウスをクロロホルムを吸引させて殺し、70%EtOHで消毒した後、開腹して脾臓を摘出した。脾臓はRPM (+FBS) (1.05% RPMI-1640、0.0004% NaHCO_3 、10% ストレプトマイシン、100U/1 ペニシリンに10%となるように牛胎児血清 (FBS) を添加したもの) で洗浄し、RPMI (DNase) (RPMIに1mg/mlとなるようにDNase Iを添加したもの) を注いだペトリ皿にいれ、ハサミで10個程度に分割した後、それぞれをスライドグラス2枚の間に軽くこすりあわせて押しつぶし、単一の細胞にした。得られた脾臓細胞はGey's solution (0.7% NH_4Cl 、0.037% KCl 、0.03% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.0024% KH_2PO_4 、0.1% グルコース、0.021% $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.007% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.017% CaCl_2 、0.1125% NaHCO_3) を加えて赤血球を溶血させ、RPMI (-FBS) で3回洗浄し、RPMI (-FBS) に懸濁した。融合に用いるミエローマ細胞も同様に洗浄し、懸濁した。脾臓細胞とミエローマ細胞を10:1に混合し、3,000rpmで12分間遠心後、上清を吸引した。沈殿をよく溶きほぐし、融合剤 (RPMI (-FBS) 1mlに1gのPEGと100 μ lのDMSOを加えたもの) 1mlを加えて細胞融合させ、60秒後にRPMI (-FBS) を1ml加えた後、さらに30秒毎にRPMI (-FBS) を1ml加える操作を4回行い、3,000rpmで12分間遠心後、上清を吸引した。沈殿した細胞が 1.5×10^5 個/mlとなるようにGIT培地で懸濁後、細胞培養マルチプレートのウェルに200 μ lづつ分注し、 CO_2 インキュベーターで一晩培養した。翌日50 μ lのHAT培地 (2mM 2-メルカプトエタノール、2mM L-グルタミン、100 μ g/ μ l ストレプトマイシン、100U/ml ペニシリン、0.001U/ml インシュリン、0.18g DHEG、2% HATとなるようにそれぞれを添加したGIT培地) を加え、さらにその4日後、培養液約50 μ lを吸引除去し、新たにHAT培地を加えた。

5) ハイブリドーマの培養

4) の操作以降は、3～4日毎に培養液約50 μ lを吸引除去し、等量のGIT培地を加え、十分な大きさのコロニーが形成されたウェルから上清を採取し、ELISA法、あるいは抗原をブロットしたメンブレンに抗体処理をし、BCIP/NBTで発色させてスクリーニングを行った。

6) クローニング

スクリーニングの結果、陽性と判断されたウェルのハイブリドーマは、限界希釈法でクローニングを行った。クローニングに先立って液体窒素中で凍結保存しておいた⁶⁰Coを15分間照射したミエローマ細胞（フィーダー細胞）をすばやく解凍し、新たな培養プレート（1ウェルあたり 2×10^4 個）に入れた。陽性ウェルのコロニー付近をパスツールピペットで静かに攪拌し、フィーダー細胞を入れた培養プレート（1ウェル）に1細胞となるように調製して加え、5)、6) の操作を繰り返すことによってクローニングと培養を行った。

7) モノクローナル抗体の採取及びハイブリドーマの保存

陽性のクローンを大量に培養した培養液は、3000 \times gで5分間遠心し、その上清を回収してアジ化ナトリウムを0.01%となるように添加してモノクローナル抗体として、4℃で保存した。陽性クローンは0～4℃に冷却した細胞凍結保存用セルバンカーに 1×10^5 /ml個以上になるように溶解し、-180℃の液体窒素中で凍結保存した。

8) ELISA法

精製した合成ペプチドをコーティングバッファー（0.05M炭酸ナトリウム pH9.6）に目的濃度となるよう溶解し、96穴マルチウェルプレート（住友ベークライト）の各穴に50 μ lずつ注入し、37℃で2時間静置した後、上清を吸引除去した。各ウェルにTTBS（20mM Tris-HCl pH7.6、0.15M NaCl、0.05%アジ化ナトリウム、0.1%Tween20）を注入し、5分間静置後、吸引除去する操作を3回繰り返して、ウェルを洗浄し、部分採血で得られた血清をTTBSで10～100倍の範囲で段階的に希釈したもの、あるいはハイブリドーマの培養上清をTTBSで2倍に希釈したもの

を各ウエルに50 μ lずつ注入し、37℃で1時間静置して1次抗体処理を行った。この場合コントロールとしてはそれぞれ非免疫マウス血清あるいはGIT培地を用いた。先と同様にTTBSで3回洗浄し、二次抗体処理はアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗マウスIgGをTTBSで1,000倍に希釈したものを各ウエルに50 μ lずつ注入し、37℃で1時間静置して行った。同様にTTBSで3回洗浄後、基質液（1mg/ml ニトロフェニルリン酸、10%ジエタノールアミン）を各ウエルに50 μ l注いで発色させ、ELISA用分光光度計で405nmの吸光度を測定した。

21. 菌体からの Totalタンパク質の抽出

凍結保存菌体2gに8mlのTotalタンパク質抽出バッファー（70mM Tris-HCl pH6.8, 870mM 2-メルカプトエタノール）と、プロテアーゼインヒビターとして1 μ Mになるようフェニルメタンスルホニルフルオリド（PMSF）を加え、高速ホモジナイザーポリトロン（PT-10-35）を用いて12,000rpmで5分間破碎した。破碎後12,000 \times gで5分間遠心を行って気泡を消し、沈殿となった破碎菌体をつき碎いて均一に懸濁させた破碎菌液800 μ lに10%SDS 230 μ lとグリセロール120 μ lを添加し、攪拌して、100℃で3分間熱処理を行った。その後、14,000rpmで5分間遠心して不溶成分を沈殿させ、上清をTotalタンパク質試料とした。

22. 培養濾液中のタンパク質の沈殿

培養液はアクリルメッシュで濾過したのち、さらに濾紙（Toyo Roshi）で2度濾過した。培養濾液20mlは等量の-20℃冷アセトンを加え、-20℃で一晩静置し、24,000 \times gで10分間遠心をして、上清を捨て、得られた沈殿を真空ポンプで風乾したものを培養濾液中のタンパク質とした。

23. 細胞分画法

1) 水溶性画分と不溶性画分の分画

生菌体を1gあたり4mlの破碎バッファー中で破碎し、 $12,000\times g$ で15分間遠心を行い、その上清800 μ lに10% SDS 230 μ lとグリセロール120 μ lを添加し、攪拌後、 100°C で3分間熱処理を行ったものを水溶性画分、沈澱を不溶性画分とした (Fig. 3)。

2) 細胞内小器官の粗分画

生菌体重1gあたり1mlの等張破碎バッファーを加え、ポリトロンホモジナイザーで14,000rpmで5分間破碎した。破碎後さらに等張バッファーを加えて約50mlに希釈し、4重に重ねたアクリルメッシュで濾過した。濾液は $1,000\times g$ で5分間遠心して、得られた沈澱を細胞壁と未破碎の菌体を含む画分とした。この上清を $5,000\times g$ で5分遠心し、得られた沈澱を粗核画分とし、この上清を $15,000\times g$ で20分遠心して、沈澱を粗ミトコンドリア画分とし、この上清を $100,000\times g$ で60分間遠心して、沈澱を細胞内微小膜画分とし、上清をサイトゾル画分とした (Fig. 4)。

3) 細胞壁画分の分画

培養5日目の菌体の生菌体重1gあたり1mlの細胞壁分画用破碎バッファー (50mM Tris-HCl pH7.6, 5mM EDTA, 0.15M NaCl, 20 μ M PMSF) を加え、高速ホモジナイザーポリトロンを用い14,000rpmで10分間破碎し、スチールメッシュで濾過し、未破碎の大きな菌体を除去した。この濾液に破碎バッファーを加えて20mlとし、菌体を完全に破碎するためFRENCH PRESS (AMINCO) で2度破碎を行った。検鏡してほぼ完全に菌糸が破碎されたのを確認した後、 $1,000\times g$ で5分間遠心して得られた沈澱の細胞質成分を除くため、洗浄バッファー (50mM Tris-HCl pH 7.6, 100 μ M EDTA, 5mM 2-メルカプトエタノール, 200 μ M PMSF) を約10ml加え、懸濁し、 $1,000\times g$ で5分間遠心して、上清を捨てる操作を5回繰り返し、得られた沈澱を細胞壁粗分画とした。この画分は氷中で生菌重1gあたり10mlの2% Triton-Xを含む破碎バッファー中で1時間攪拌して膜成分を除去後、洗浄バッファーで5回洗浄し、細胞壁画分とした。破碎直後に $1,000\times g$ で5分間遠心を行い、細胞壁を得たあとの上清は、等量の冷アセトンを加え、 -20°C で一晩静置し、 $2,4000\times g$ で10分間遠心をして、上清を捨て、沈澱を真空ポンプで乾燥させ、上清画分とした

(Fig. 5)。

4) ミトコンドリア画分の分画

生菌体重1gあたり1mlの等張破碎バッファーを加え、ポリトロンホモジナイザーで14,000rpmで5分間破碎した。破碎後さらに等張バッファーを加えて約50mlに希釈し、4重に重ねたアクリルメッシュで濾過した。得られた濾液は5,000×gで10分間遠心して、上清を回収し、15,000×gで15分間遠心して沈澱を得た。沈澱はミトコンドリア精製バッファー（0.8Mサッカロース、10mM Tris-HCl pH7.4、1mM EDTA、0.1%BSA）に懸濁して、10mM Tris-HCl pH7.4、1mM EDTA、0.1%BSAを含む1M～2Mのサッカロース密度勾配に重層して、80,000×gで90分間遠心した。遠心後比重1.18g/ml付近の褐色のバンドを回収して破碎バッファーで1/6に希釈して、15,000×gで15分間遠心して得られた沈澱をミトコンドリア画分とした（Fig. 6）。

24. 酸-アルカリを用いた細胞壁画分からのタンパク質の抽出

得られた細胞壁画分に、氷冷した0.5M HClを生菌重1gあたり5ml加え、氷上で10分間攪拌し、直ちに0.5M NaOHでpH7.0～7.5に中和し、目的タンパク質を可溶化した。これを10,000rpmで10分間遠心し、上清に最終濃度10%となるようにトリクロロ酢酸を加えて、氷上に1時間静置し、24,000×gで30分遠心し、沈澱を得た。沈澱は5%トリクロロ酢酸で洗浄後、80%アセトンで洗浄し、風乾して、試料とした（第2図）。

25. タンパク質の電気泳動

1) 等電点ゲル電気泳動

等電点ゲル電気泳動はO'Farrellの方法（1975）を若干改良したものをを用いた。内径0.2mmのガラス管内に等電点電気泳動用ポリアクリルアミドゲル（3.5%アクリルアミド、12.3M尿素、3.3%NP-40、3.8%アンフォライン（pH3.5～10））を高

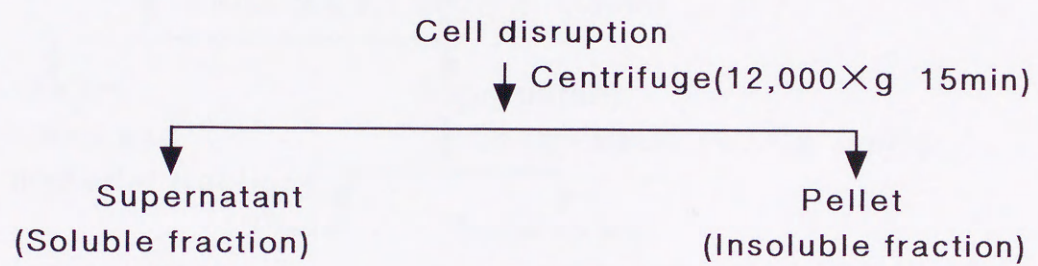


Fig3. Soluble and insolble fractionations of cells

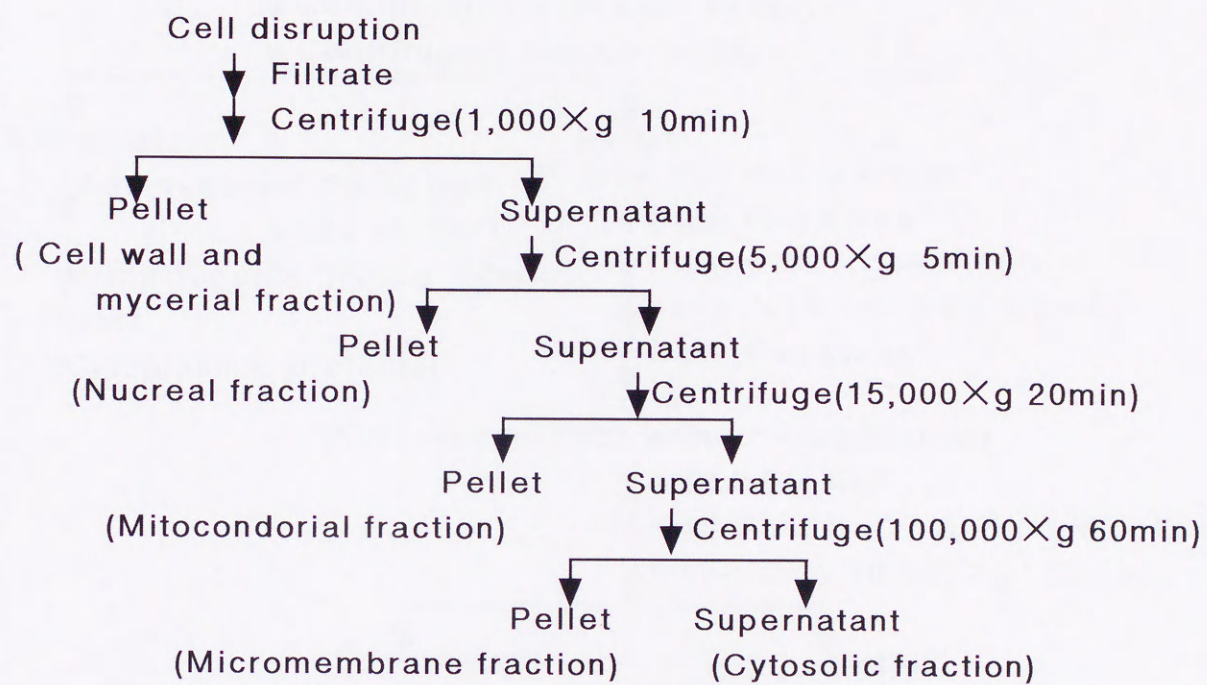


Fig.4. Fractionation of cell organella

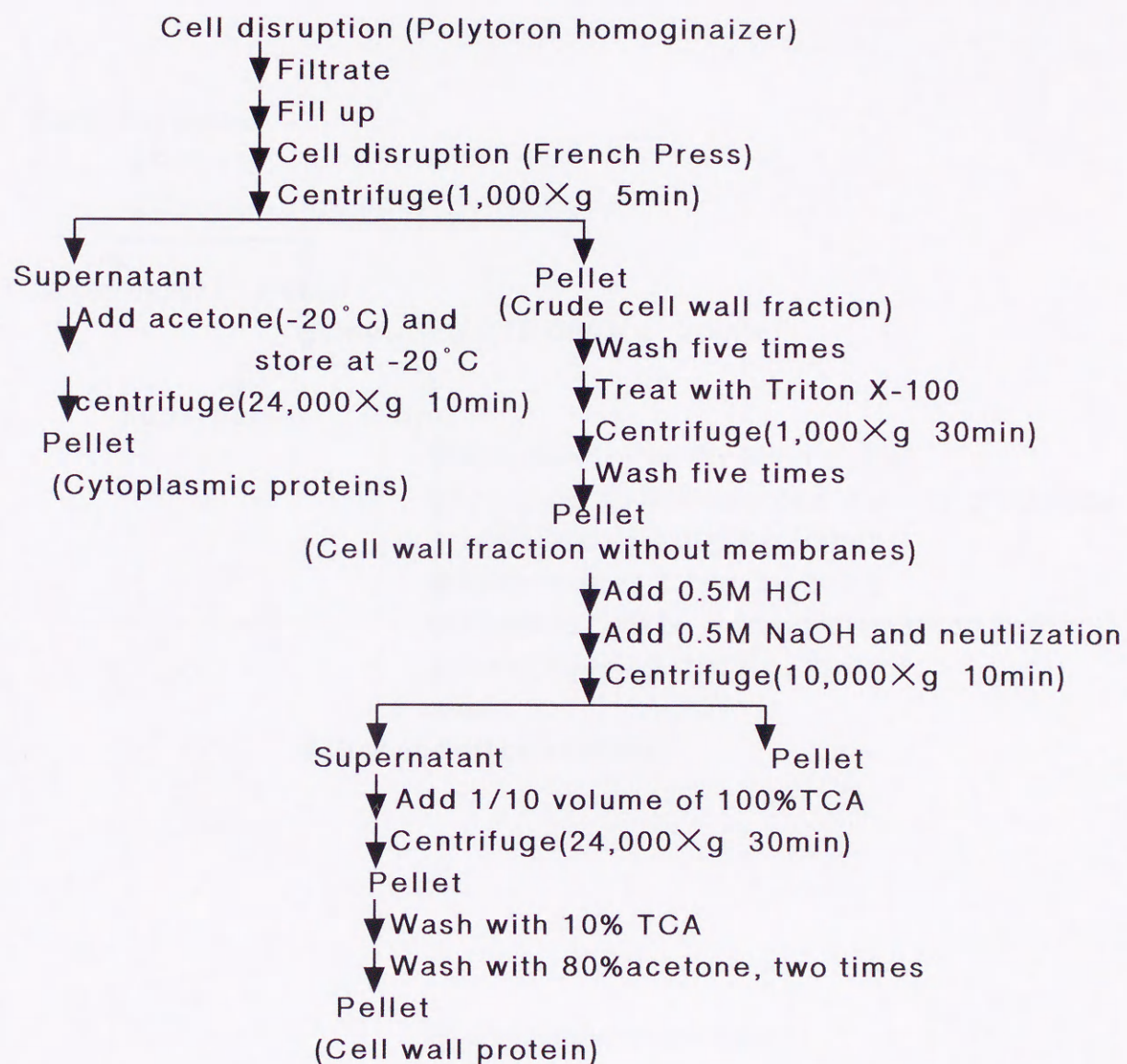


Fig.5 Cell wall fractionation and protein extraction

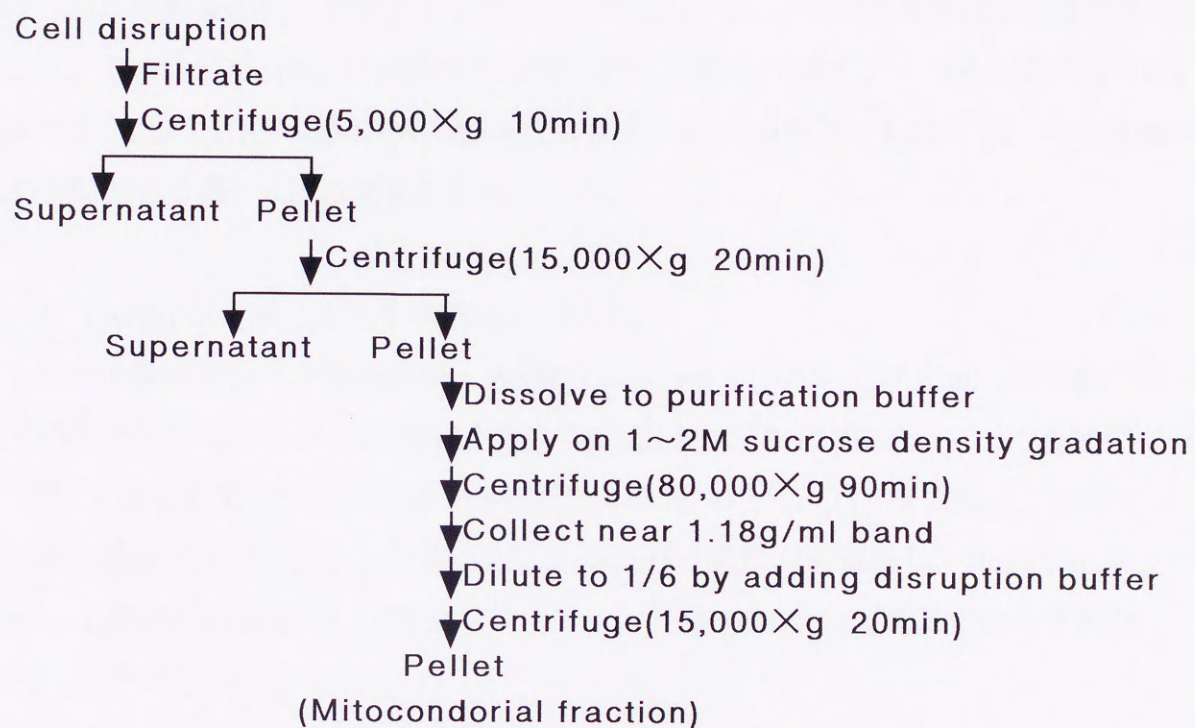


Fig.6 Mitochondrial fractionation

さ8cmに充填し、陽極側電極液（下層）に0.02Mリン酸、陰極側（上層）に10% TEMEDを用いて定電圧200Vで15分、300Vで15分、400Vで30分プレラン後、バッファーを交換し、Lysis緩衝液（8M尿素、2%NP-40、2%アンフォライン、5% 2-メルカプトエタノール）に溶解し、10℃で1時間インキュベートしたタンパク試料をのせ、定電圧400Vで16~18時間泳動後、更に定電圧800Vで1時間泳動を行った。泳動後のゲルはゲルとガラス管の間にシリンジでMilliQを注入して取り出した。この後SDS-PAGEで展開する場合はサンプルバッファー（65mM Tris-HCl pH6.8、2.5% SDS、5% 2-メルカプトエタノール、10% グリセロール）中で室温で20分間振とう後、-20℃で凍結保存をした。

2) Laemmliの系による不連続SDS-PAGE

高分子量のタンパク質の泳動・分離はLaemmli（1970）の系に従って分離ゲル（10%アクリルアミド、0.38mM Tris-HCl pH8.8、0.1% SDS）の上に濃縮ゲル（5%アクリルアミド、25mM Tris-HCl pH6.8、0.1% SDS）を重層し、固化させた後、サンプルバッファーで可溶化したタンパク質試料を重層し、Runningバッファー（25mM Tris-HCl、192mMグリシン、0.1% SDS）で定電流25mAで泳動した。

3) Low-BIS濃度SDS-PAGE

低分子量のタンパク質の泳動・分離にはHirano（1989）の系を用いた。分離ゲル（18%アクリルアミド、0.38mM Tris-HCl pH6.8、0.1% SDS）の上に、濃縮ゲル（5%アクリルアミド、125mM Tris-HCl pH6.8、0.1% SDS）を重層し、ランニングバッファー（25mM Tris、192mM グリシン、1% SDS）を用い、定電流25mAで泳動した。

4) Tricine-SDS-PAGE

10kDa以下のタンパク質の泳動・分離にはTricine-SDS-PAGE（Schagger et al. 1987）を用いた。分離ゲル（16.2%T・6%Cアクリルアミド、1M Tris、0.1% SDS、0.13%グリセロール）の上に濃縮ゲル（4%T・3%Cアクリルアミド、0.75M

Tris、0.75% SDS) を重層し、陽極側電極液を0.2M Tris、陰極側電極液を0.1M Tris、0.1M Tricine、0.1% SDSとして定電流20mAで泳動した。

5) 2D-PAGE

1次元目に等電点電気泳動を行ったゲルを、2次元目はSDS-PAGEによって展開した。2次元目はコームを挿さずに濃縮ゲルを重層したゲルを作製し、等電点電気泳動後にサンプルバッファーで20分×2回振とうして、ゲル中のタンパク質をSDS化したゲルディスクを1%電気泳動用アガロースを含むサンプルバッファーで濃縮ゲル上に固定して泳動した。

26. ゲルの染色

等電点電気泳動をしたゲルは15%トリクロロ酢酸中で2時間固定後、脱色液 (25%エタノール、8%CH₃COOH) で洗浄後、染色液 (0.1% Coomassie Brilliant Brue R、45%エタノール、10%CH₃COOH) で1時間染色し、脱色液中で一晩脱色した。

SDS-PAGEのゲルはCBB染色液 (0.1% Coomassie Brilliant Brue R、50%メタノール、7%CH₃COOH) で30分間染色後、脱色液 (20%メタノール、10%酢酸) 中で2時間～一晩脱色した。

27. ゲルからのバンドの切り出し

材料及び方法の18-2) -3) の方法で泳動後のゲルはCBB染色液で10～20秒間洗浄後、MilliQで洗浄し、目的のバンドを切り出して、MilliQ中で洗浄した。ゲルを保存する際は、MilliQに浸せきしたまま、-20℃で凍結保存した。

28. 切り出したゲルからのタンパク質の溶出

ゲルからのタンパク質の溶出にはエレクトロエリユーションによって行った。洗

浄後のゲルは細かく切断し、透析膜を張ったコンセントレーションカップ

(ATTO) に入れてRunningバッファー (25mM Tris-HCl、192mMグリシン、0.1% SDS) を注ぎ、1.5Wの定電力で1.5時間泳動した。コンセントレーションカップの濃縮ウェル側に濃縮されたタンパク質は、MilliQを数回交換しながら4℃で1晩透析し、真空乾燥機によって乾燥し、精製タンパク質とした。

29. ペプタイドマッピング

ペプタイドマッピングはPlougら (1989) の方法をもとに、Protease Kで断片化して、Tricine SDS-PAGEによって分離した。切り出したゲルは平衡バッファー (10mM Tris-HCl pH7.8、10mM EDTA、0.5% SDS) 中で1時間室温で平衡化し、Tricine SDS-PAGEの濃縮ゲルのコーム部に差し込んだ。ゲルの上層に20 μ g のProtease Kを重層し、さらにその上にBPBを重層して、20mAの定電流で泳動した。BPBが濃縮ゲル中に入り込んだところで、1時間泳動を停止してProtease Kによるタンパク質の断片化を行い、再び20mAの定電流で泳動して断片化したタンパク質の分離を行った。

30. ウェスタンブロッティング

1) ニトロセルロースメンブレンへの転写

ブロッティングはセミドライブロッティング装置 (TRANS BLOT CELL. SD BioRad) を用いて、下から順に、①ブロッティングバッファー (25mM Tris、20% メタノール、192M グリシン) に浸せきした濾紙②予めブロッティングバッファーで5分以上浸せきしていたニトロセルロースメンブレン (ADVANTEC) ③泳動後のゲル④ブロッティングバッファーに浸せきした濾紙、の順で重ね、1cmあたり0.8mAの定電流で1時間ブロッティングを行った。

2) PVDF膜への転写

泳動後のゲルは、Hirano et al. (1990)の系に従って、ブロッティングバッファー

C (0.3M Tris, 20% メタノール, 0.1% SDS) で約5分間振とうした後、セミドライブロットング装置 (BIO RAD社) を用い、下から順に①ブロットイングバッファA (0.3M Tris, 20% メタノール, 0.1% SDS) を含ませた濾紙、②ブロットイングバッファB (25mM Tris, 20% メタノール, 0.1% SDS) を含ませた濾紙、③メタノールで約5秒間ウェットングした後、5分以上ブロットイングバッファC中で振とうしたPVDF膜、(BIO RAD Cat. No.162-0182) ④ゲル、⑤ブロットイングバッファCを含ませた濾紙の順に重ね、1cm²あたり1mAの定電流下で1.5時間または3時間転写を行った。転写後のPVDF膜はMilli-Q水中で5分間の振とうを3回繰り返してブロットイングバッファを除去し、抗体によるタンパク質の検出に供した。

31. 抗体の精製

抗血清はPringle et al. (1991) によるアフィニティ精製を若干変更して精製した。PVDF膜に約1 μ gの抗原タンパク質をブロットし、ボンソーS (0.1%ボンソーS、2%酢酸) 中で数秒間染色し、脱色液 (1%酢酸) で5分間×2回脱色した。メンブレン上に染色されたバンドは脱色液中で切り出し、MilliQで洗浄し、バンドを脱色するため200 μ M NaOH中で2分間振とうし、再びMilliQで洗浄した。PVDF膜はPBS (10mMリン酸バッファ、0.15M NaCl) 中で室温にて10分間×3回振とうし、スキムミルクとTween 20がそれぞれ5%と0.1%になるように加えたPBS

(PBST-Milk) に浸漬して37°Cで3時間ブロッキングを行った。抗血清200 μ lは0.3% BSAと0.1%アジ化ナトリウムを含むPBS4mlで希釈し、ブロッキング後のPVDF膜を入れ、37°Cで16~20時間振とうして抗体の吸着を行った。抗体処理後のPVDF膜は5%PBST-Milkで20分×3回洗浄し、PBSで10分間洗浄後、500 μ lの0.2M Glycine-HCl pH2.5中で2分間激しく振とうして、抗体を解離させ、直ちに6.9%BSAを含む1M Tris-HCl pH8.8を85 μ l加えて中和した。得られた精製抗血清は0.5%となるようにアジ化ナトリウムを添加し、4°Cで保存した。抗原をブロットしたPVDF膜はPBSで洗浄後、ブロッキング後に行った操作を10回程度繰り返して精製に用いた。

IV 結果及び考察

1. 菌糸融合第4群 (AG4) の解析

AG4に属する菌株のうち、本研究では1271 (プラスミドを保持していない菌株)、R101 (pRS64-1を保持)、GM-11 (pRS64-2を保持)、RI-64 (pRS64-1、-2、-3を保持) の4菌株を供試して解析を行った。AG4の保持するプラスミド、pRS64の構造と、予想されたORFはFig.7~10に示した (宮坂1996、桂1997より改変し抜粋)。

1) 生菌重の経時変化

菌体はPD培地で前培養後、ホモジナイズしてPPD培地に接種し、経時的にサンプリングして、1シャーレあたりの生菌重として測定した。

生菌重は接種後1日目は僅かに増加したが、2~3日目は急速に増加し、4日目以降の増加は停止した。接種後14日目を経過すると、生菌重は4菌株とも減少傾向を示した。RI-64菌株は他の3菌株に比べて低い増加傾向だった (Fig.11)。

2) 相同RNAの検出

経時的にサンプリングして凍結保存した菌体からTotal RNAを抽出し、グリオキサル変性下で泳動を行い、ノザンブロッティング後、DIG標識されたプローブで検出を行った。Total RNAは20 μ g泳動し、プローブはHongo et al. (1994) がクローニングしたプラスミド上のORF予想部位を用いた (Fig. 12)。

プラスミドを保持しているR101、GM-11、RI-64の各菌株は全ての培養期間を通して大きさ0.5kbのバンドが検出された (Fig.14~16)。このバンドは培養期間を通じて増減しなかった。さらに、検出に供した菌株の全てにおいて、大きさ約1.2kbのバンドが検出された (Fig. 13~16)。このバンドはプラスミドを保持しない1271菌株では接種後2~4日目に観察されたが、他の3菌株では接種後1~7日目に

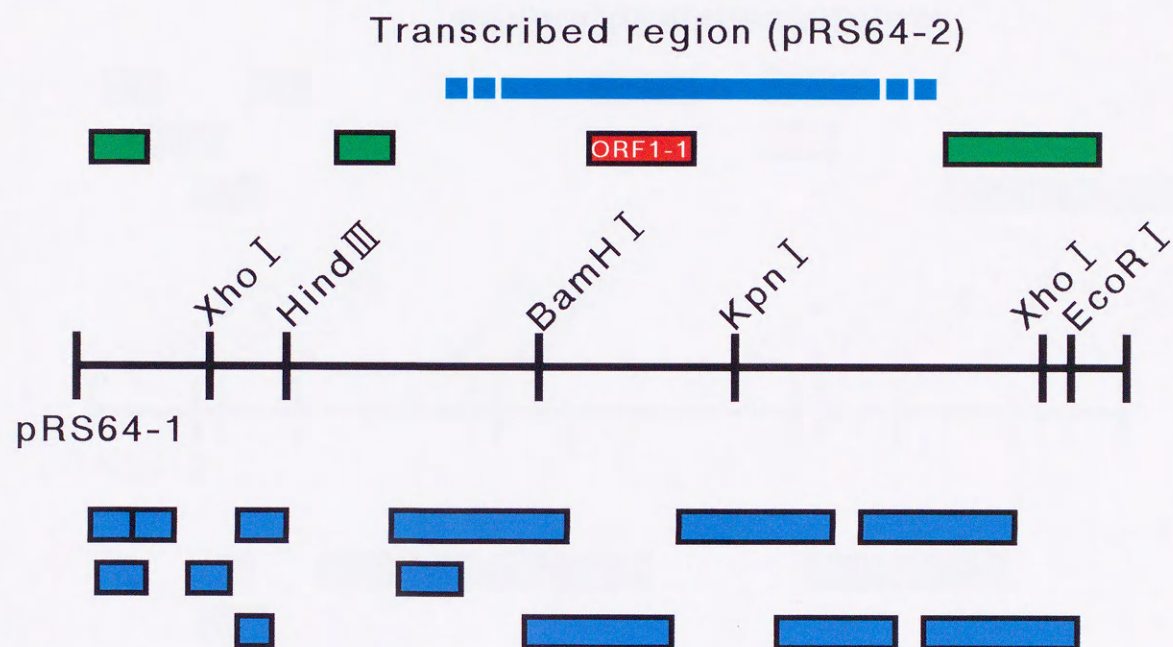


Fig.7. Expected open reading frames(ORF) in pRS64-1 using ORF finder softwear in GenomeNET. Indicated ORFs are more larger than 50aa. The green and red boxes are coded on sense chain (+ strand), and the blue boxes are complemental chain (- strand). Red box indicates the possible ORF to translate. Location of transcript is indicated by light blue box.

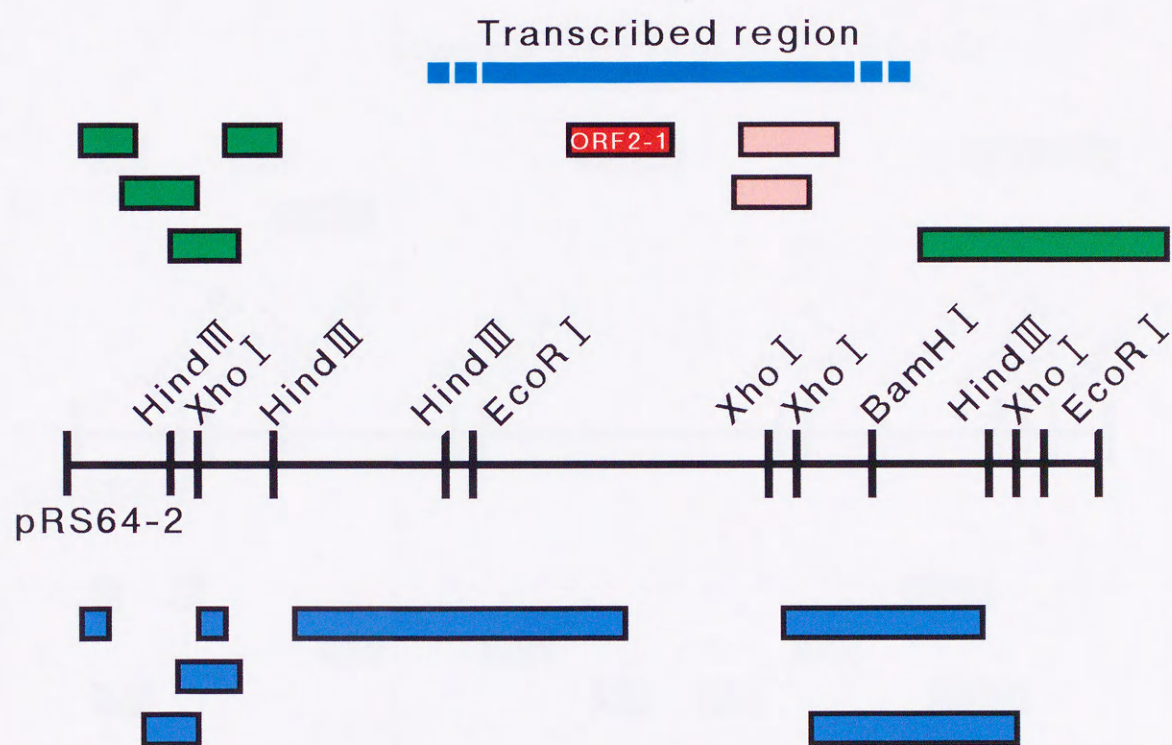


Fig.8. Expected open reading frames(ORF) in pRS64-2 using ORF finder softwear in GenomeNET. Indicated ORFs are more larger than 50aa. The green, red and pink boxes are coded in sense chain (+ strand), and the blue boxes are complemental chain (- strand). Red and pink boxes indicate the possible ORF to translate. Location of transcript is indicated by light blue box.

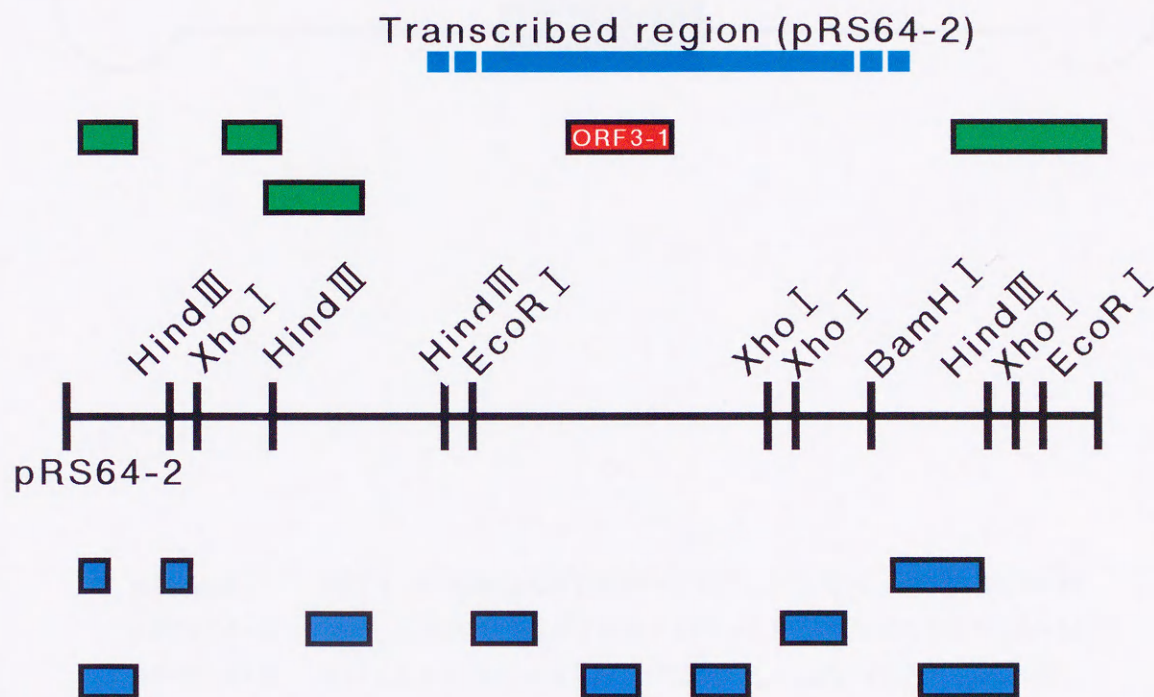
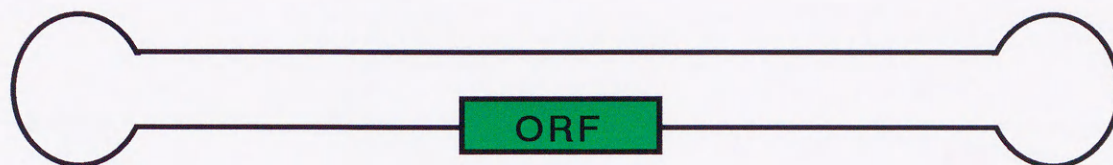


Fig.10. Expected open reading frames(ORF) in pRS64-3 using ORF finder softwear in GenomeNET and DNASIS softwear. Indicated ORFs are more larger than 50aa. The green and red boxes are coded on sense chain (+ strand), and the blue boxes are complemental chain (- strand). Red box indicates the possible ORF to translate. Location of transcript is indicated by light blue box.

pRS64



pRS64-1 MTLLPKAGFTNRPDRSLPGVNSASGRSWM
 pRS64-2 MTLLPKAGGFTNRPDRSLPGANSASCRSWM
 pRS64-3 MTLLPKAGFTNRPDWSLPGVNSASGRSWL

KLPCKSEGNCLSMPWGMVLSSHSLSGLDRLPLEPPKVA*
 KLPWKSEGHCHSMARAMVLSSHSLSGSDRLPLEPPKVA*
 KLPWKSEGSCLSILWSMVLSSHSLSGLDRLPLEPPKVA*

Fig.10. Deduced amino acid (aa) sequences of ORF encoded in pRS64-1,2,3. All ORF coded 68aa. Orange color letters indicate unmatched aa.

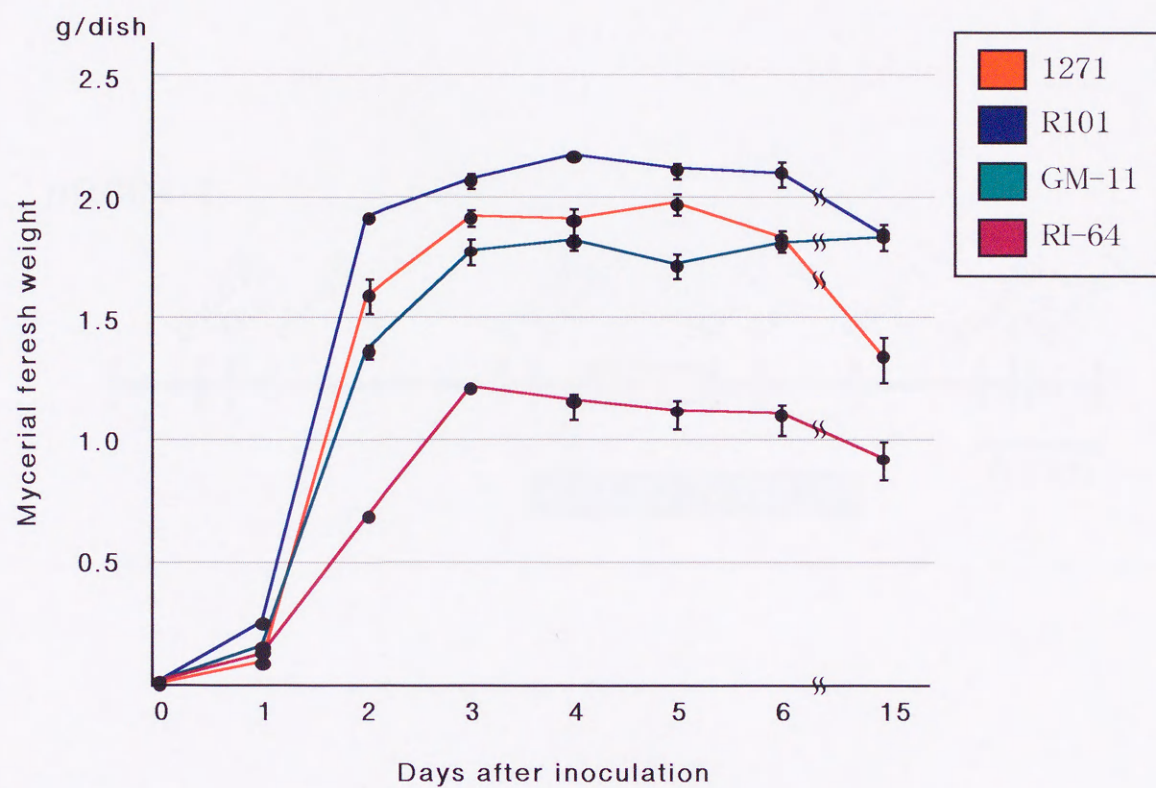


Fig.11. Mycelial fresh weights of days after inoculation.

pRS64-2

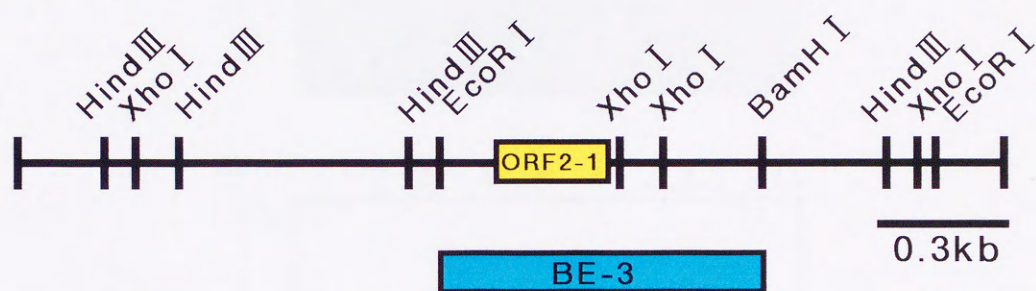


Fig.12. Partial restriction map of pRS64-2 plasmid. Yellow box indicates position and orientation of open reading frame (ORF) of pRS64-2. Restriction fragment, BE-3 (blue box) was used as hybridization probe in Northern blot analysis.

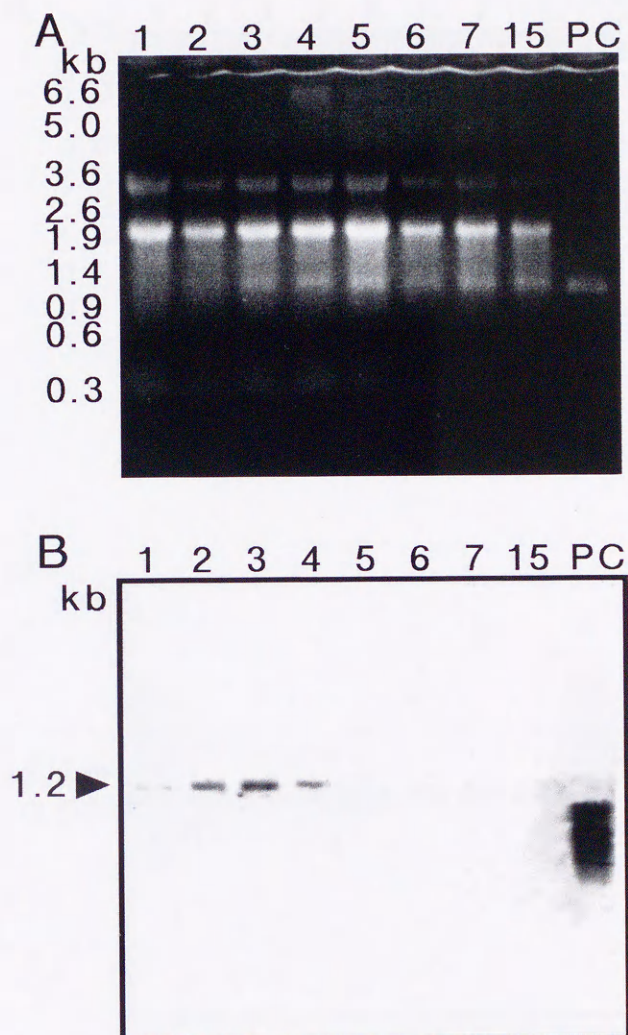


Fig.13. Northern hybridization analysis of the total RNAs extracted from 1271 isolate

(A) Total RNA from the isolate was separated by electrophoresis and stained with etidium bromide.

(B) Total RNA from the gel in (A) was blotted onto nitrocellulose membrane and hybridized to the cloned BE-3 of pRS64-2 (Fig. 10) .

Lane numbers indicates days after inoculation. Molecular weight markers are indicated on the left. PC indicates BE-3 probe. Position of the 1.2kb is indicated with arrow.

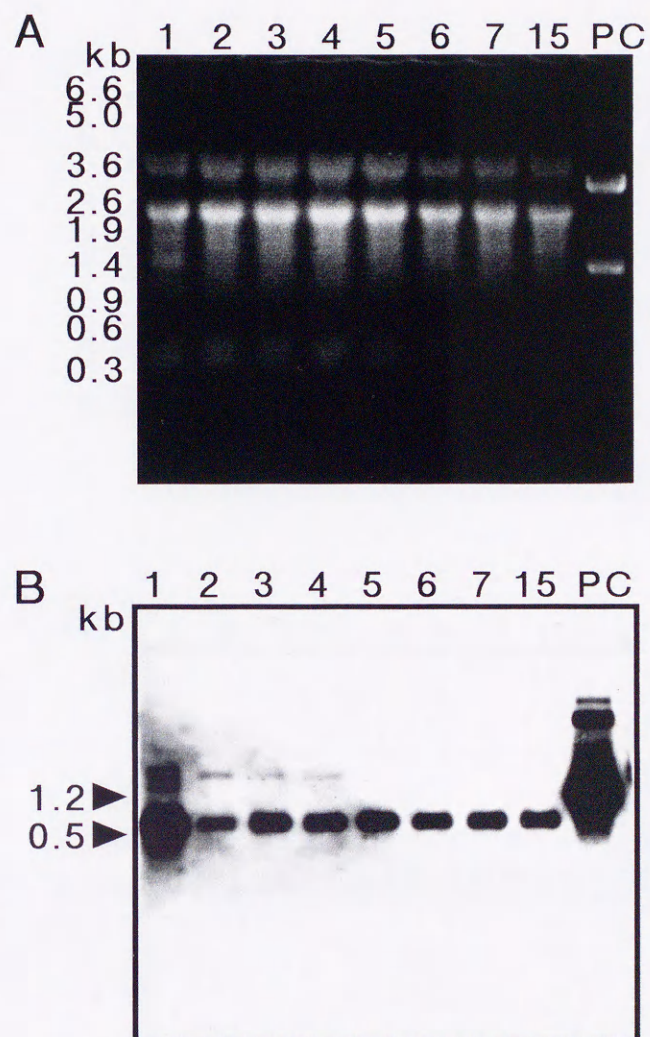


Fig.14. Northern hybridization analysis of the total RNAs extracted from R101 isolate

(A) Total RNA from the isolate was separated by electrophoresis and stained with etidium bromide.

(B) Total RNA from the gel in (A) was blotted onto nitrocellulose membrane and hybridized to the cloned BE-3 of pRS64-2 (Fig. 10) .

Lane numbers indicate days after inoculation. Molecular weight markers are indicated on the left. PC indicates BE-3 probe. Position of the 1.2kb and 0.5kb are indicated with arrows.

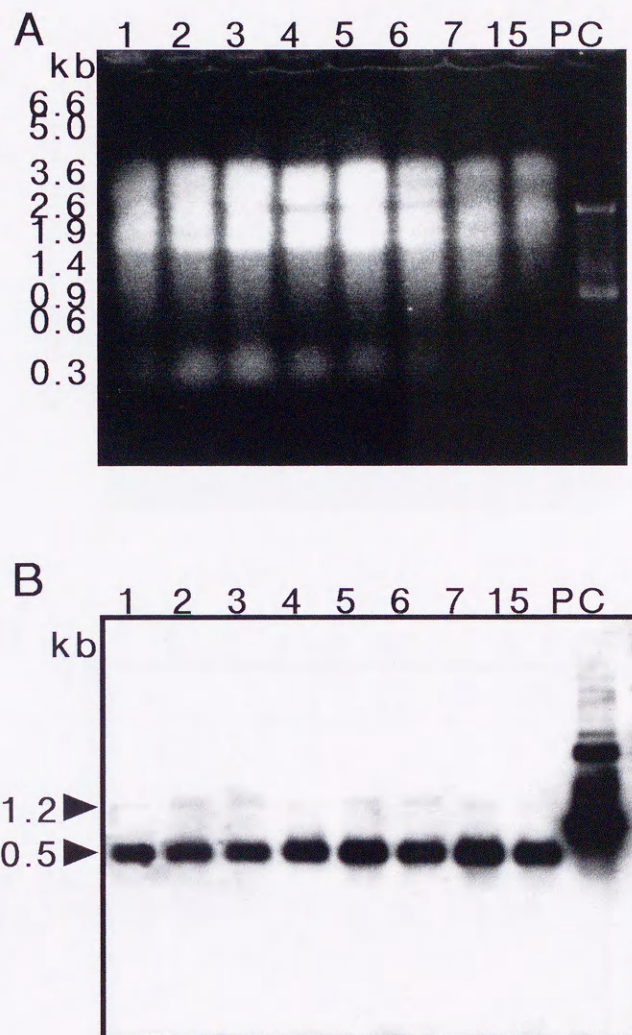


Fig.15. Northern hybridization analysis of the total RNAs extracted from GM-11 isolate

(A) Total RNA from the isolate was separated by electrophoresis and stained with etidium bromide.

(B) Total RNA from the gel in (A) was blotted onto nitrocellulose membrane and hybridized to the cloned BE-3 of pRS64-2 (Fig. 10) . Lane numbers indicate days after inoculation. Molecular weight markers are indicated on the left. PC indicates BE-3 probe. Position of the 1.2kb and 0.5kb are indicated with arrows.

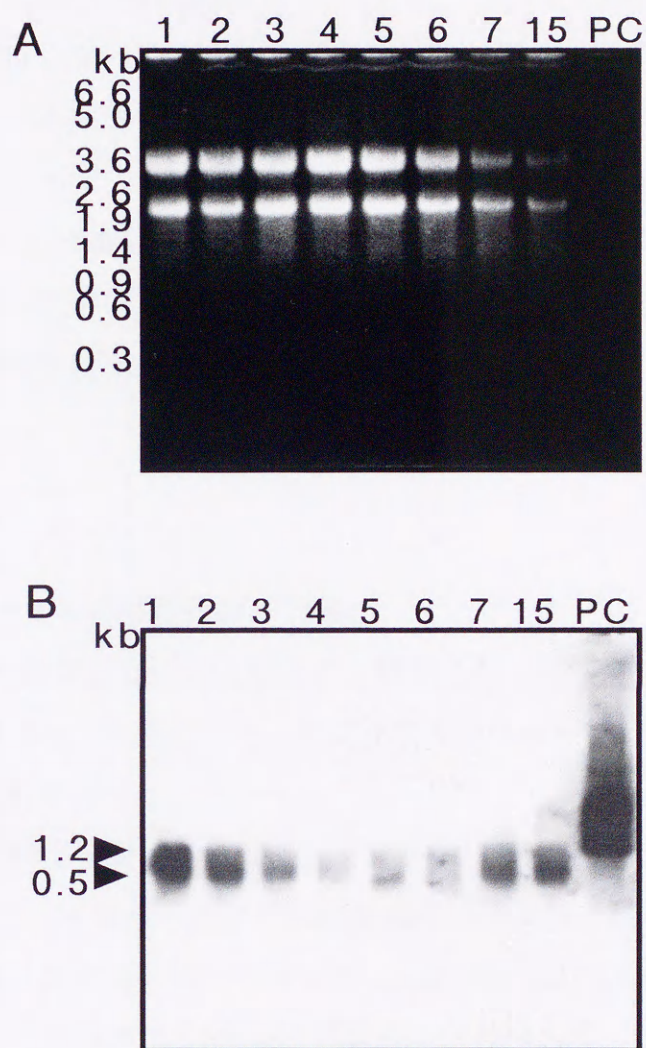


Fig.16. Northern hybridization analysis of the total RNAs extracted from RI-64 isolate

(A) Total RNA from the isolate was separated by electrophoresis and stained with etidium bromide.

(B) Total RNA from the gel in (A) was blotted onto nitrocellulose membrane and hybridized to the cloned BE-3 of pRS64-2 (Fig. 10) .

Lane numbers indicate days after inoculation. Molecular weight markers are indicated on the left. PC indicates BE-3 probe. Position of the 1.2kb and 0.5kb are indicated with arrows.

観察された。

3) ゲノム上における相同配列

プラスミドを保持しない1271菌株にプラスミドの配列とハイブリダイズするRNAがあったことから、本菌からTotal DNAを抽出して制限酵素で切断し、電気泳動後アルカリ変性させてサザンブロットを行い、解析を行った。プローブはpRS64-1の2.2kbの*Xho*I断片とpRS64-2の1.5kbの*Xho*I断片をラジオアイソトープラベルしたものをプローブとして用いた (Fig. 17)。ハイブリダイズは約8.8、6.6、4.0、2.8kbの*Bam*HI断片と、8.4、5.4、4.0、3.6kbの*Eco*RI断片とハイブリダイズした (Fig. 18)。

4) モノクローナル抗体の作製と力価

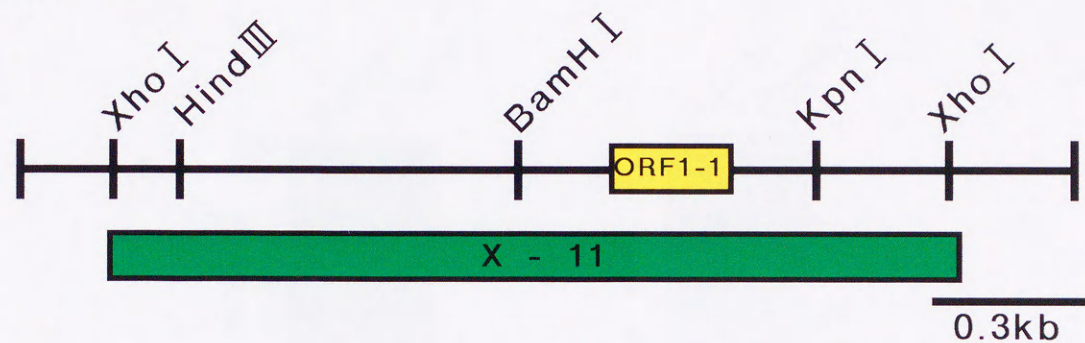
RS64に対する特異性をさらに上昇させ、検出された相同タンパク質とRS64の相同性に対して検討を行うために、モノクローナル抗体を作成して相同タンパク質との反応について検討を行った。

はじめに、RS64を2等分した合成ペプチドを作製し、N末端側をRS64-N、C末端側をRS64-Cとして、それぞれをマウスに免疫し抗体作製を試みたが、どちらを免疫した場合も抗体の力価は上昇しなかった (Fig. 19、20)。大腸菌内でGSTとの融合タンパク質として発現させたRS64を抗原として免疫を行ったところ、4回の免疫でN末側合成ペプチドに対して力価が十分に上昇した (Fig. 21、22)。このマウスの脾臓細胞を用いてハイブリドーマを作製し、スクリーニング後、モノクローナル抗体を得た。得られた抗体でニトロセルロース膜にブロットした合成ペプチドに対して検出を行ったところ、N末側と強く反応した (Fig. 23)。

5) 全タンパク質から相同タンパク質の検出

培養5日目の上記の各4菌株を供試し、Total タンパク質を抽出した。プラスミド上にコードされたタンパク質の予想分子量が7kDaと低分子量だったため、Low-

pRS64-1



pRS64-2

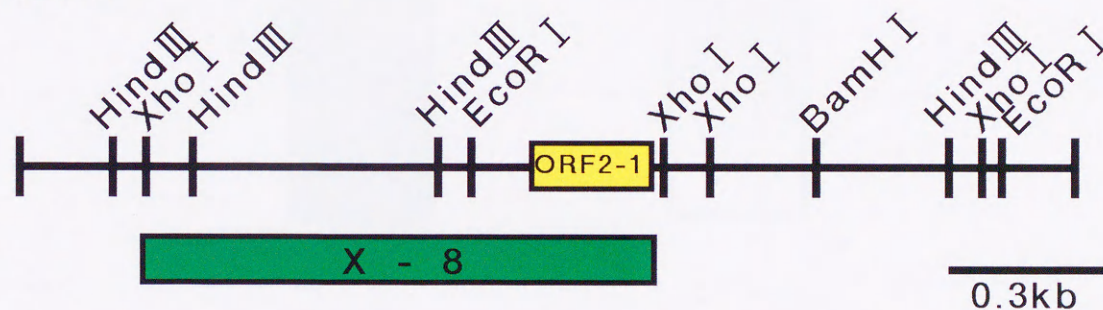


Fig.17. Partial restriction maps of pRS64 plasmids.

Yellow boxes, ORF1-1 and ORF2-1 indicate position and orientation of open reading frames (ORF) of plasmid pRS64-1 and 64-2, respectively. Restriction fragments (X-11 and X-8) were used as hybridization probe in southern blot analysis.

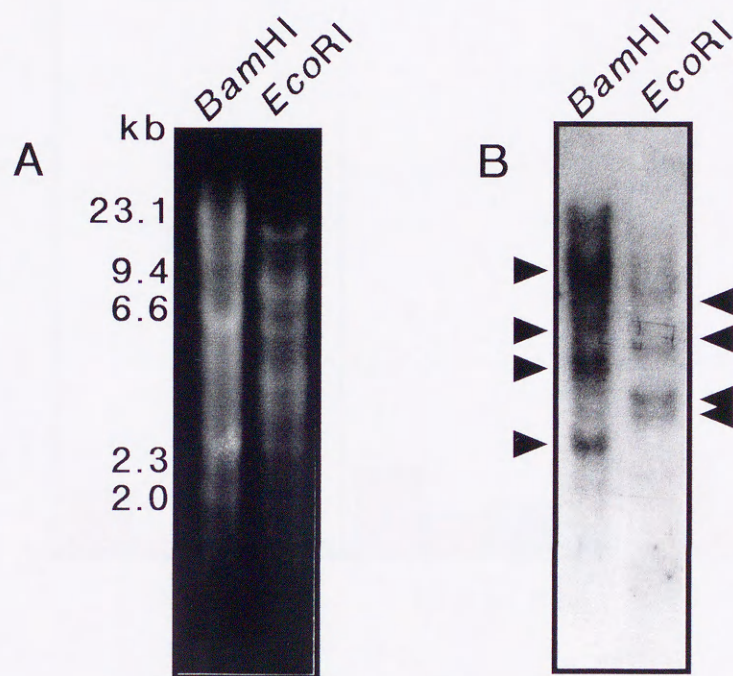


Fig. 18. Detection of a nuclear sequence.

(A) Gel-electrophoretic analysis of restriction enzyme digests of nuclear DNA from 1271 isolate.

(B) Result of hybridization of Southern transfer strip from (A) with cloned pRS64 DNA probes, X-8 and X-11 (see Fig.15). Nuclear DNA was digested with *Bam*H I and *Eco*R I. Molecular weight markers are indicated on the left. Hybridized signals are indicated with arrows.

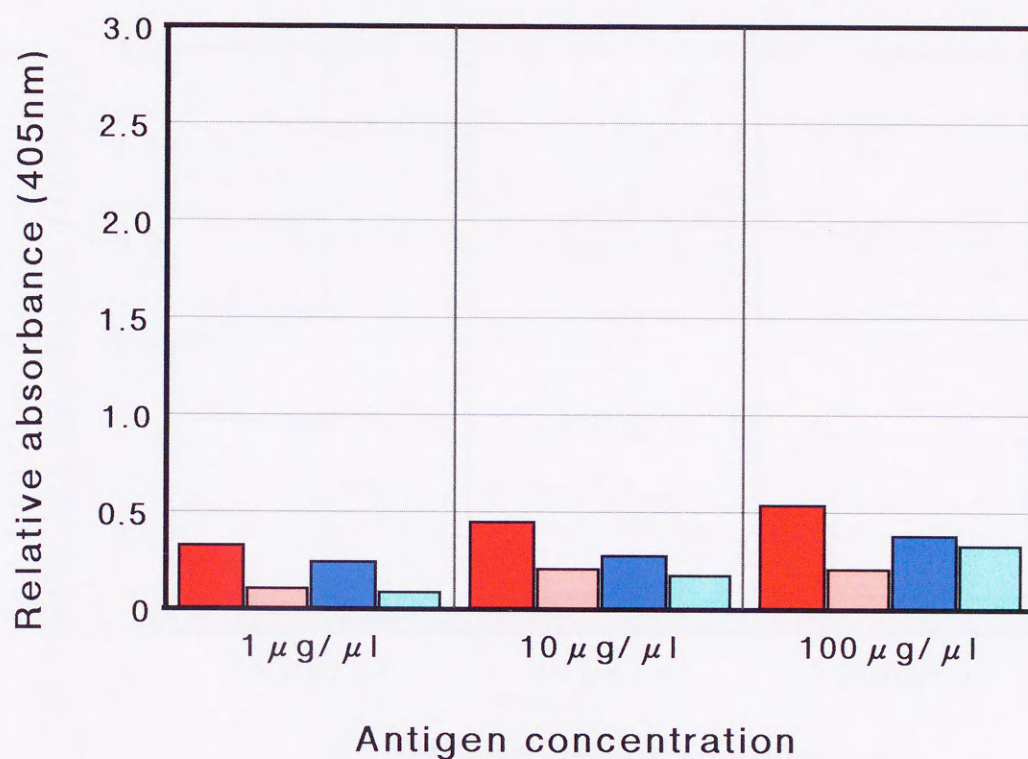


Fig.19. Immunity of the mouse anti-pRS64-encoded protein (RS64) antibody raised against to the synthetic peptide (35-amino acid residues from ORF1-1 N-terminal).

Injection was operated three times. The immunity of the antibody was estimated by ELISA. The red bars (■) indicate using 1/10-diluted antiserum of the injected mouse, the blue bars (■) indicate 1/10-diluted non-injected mouse, the pink bars (■) indicate 1/100-diluted injected mouse, and the light blue bars (■) indicate 1/100-diluted non-injected mouse.

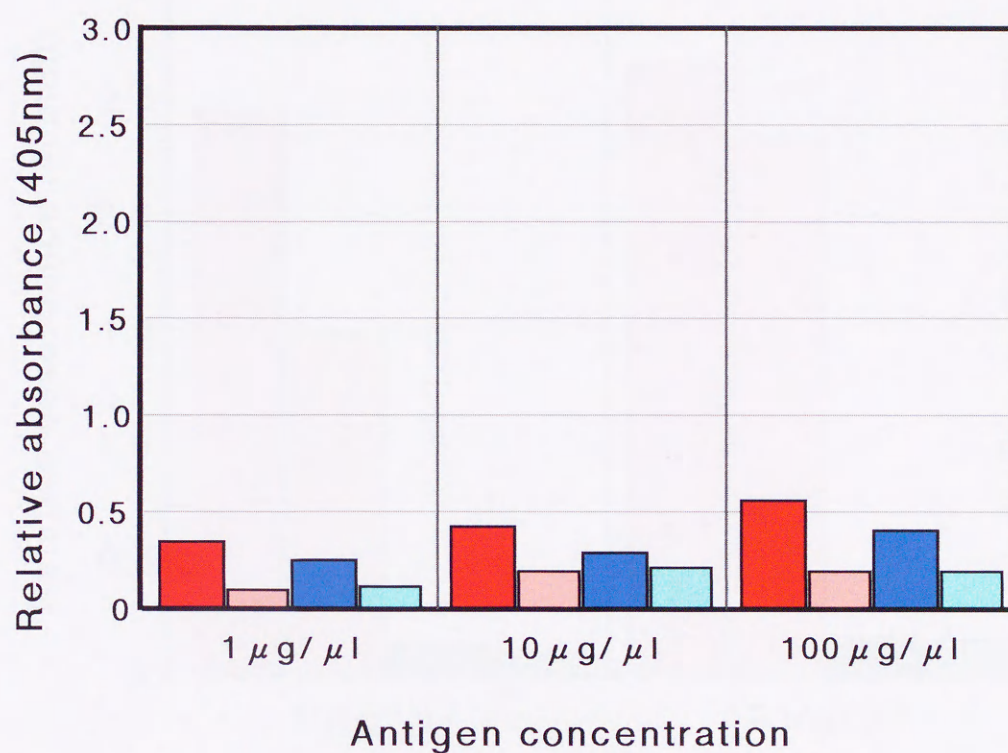


Fig.20. Immunity of the mouse anti-pRS64-encoded protein (RS64) antibody raised against to the synthetic peptide (33-amino acid residues from ORF1-1 C-terminal).

Injection was operated six times. The immunity of the antibody was estimated by ELISA. The red bars (■) indicate using 1/10-diluted antiserum of the injected mouse, the blue bars (■) indicate 1/10-diluted non-injected mouse, the pink bars (■) indicate 1/100-diluted injected mouse, and the light blue bars (■) indicate 1/100-diluted non-injected mouse.

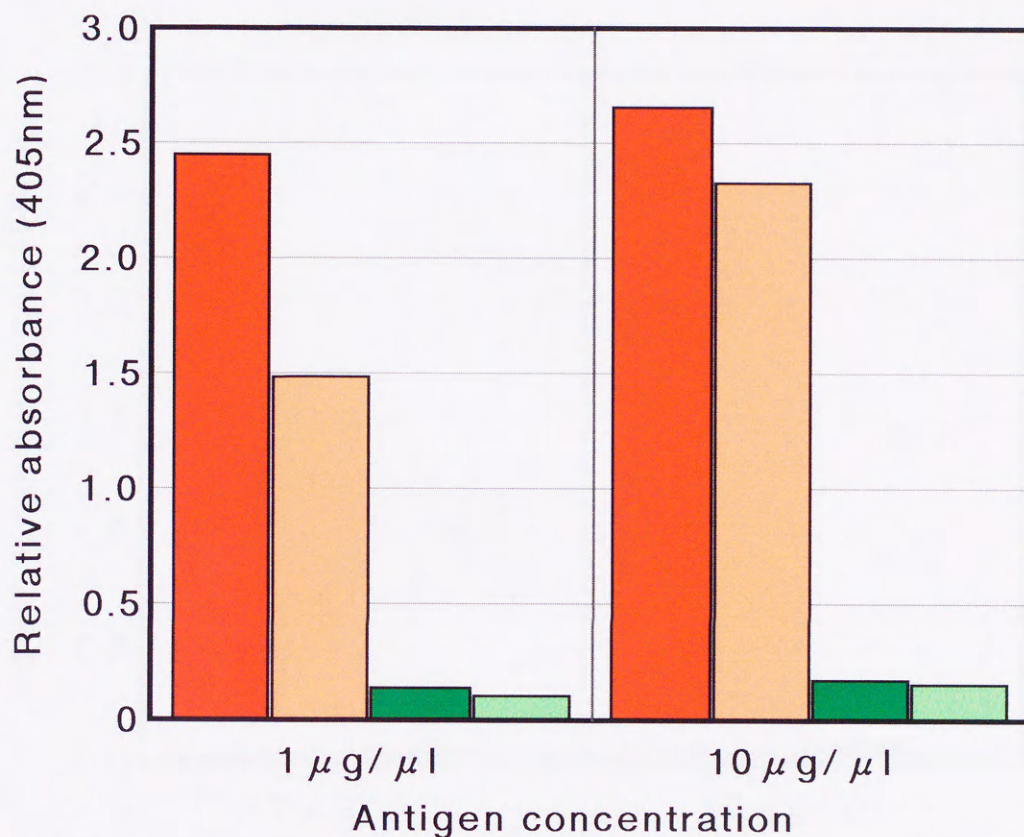


Fig.21. Immunity of the mouse anti-pRS64-encoded protein (RS64) antibody raised against to the GST fusion protein of RS64.

Injection was operated four times. The immunity of the antibody was estimated by ELISA, using the synthetic peptide (35-amino acid residues from ORF1-1 N-terminal).

The red bars (■) indicate using 1/20-diluted antiserum of the injected mouse, the orange bars (■) indicate 1/50-diluted non-injected mouse, the green bars (■) indicate 1/20-diluted injected mouse, and the light green bars (■) indicate 1/50-diluted non-injected mouse.

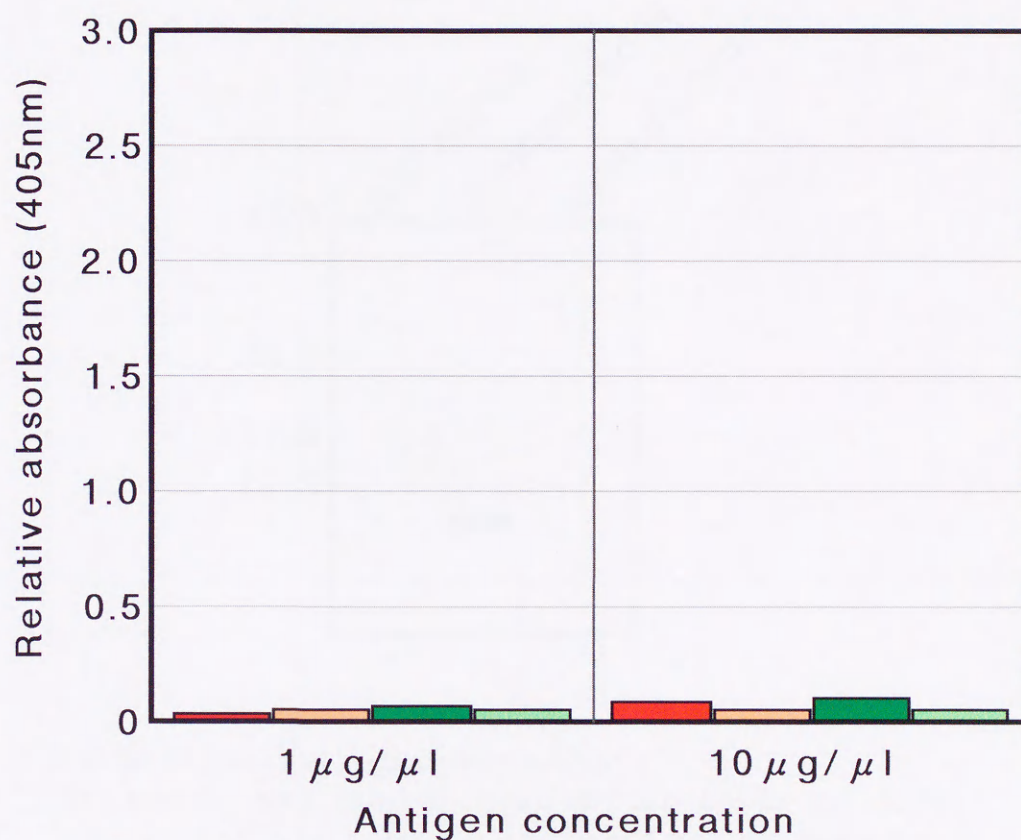


Fig.22. Immunity of the mouse anti-pRS64-encoded protein (RS64) antibody raised against to the GST fusion protein of RS64.

Injection was operated four times. The immunity of the antibody was estimated by ELISA, using the synthetic peptide (33-amino acid residues from ORF1-1 C-terminal).

The red bars (■) indicate using 1/20-diluted antiserum of the injected mouse, the orange bars (■) indicate 1/50-diluted non-injected mouse, the green bars (■) indicate 1/20-diluted injected mouse, and the light green bars (■) indicate 1/50-diluted non-injected mouse.

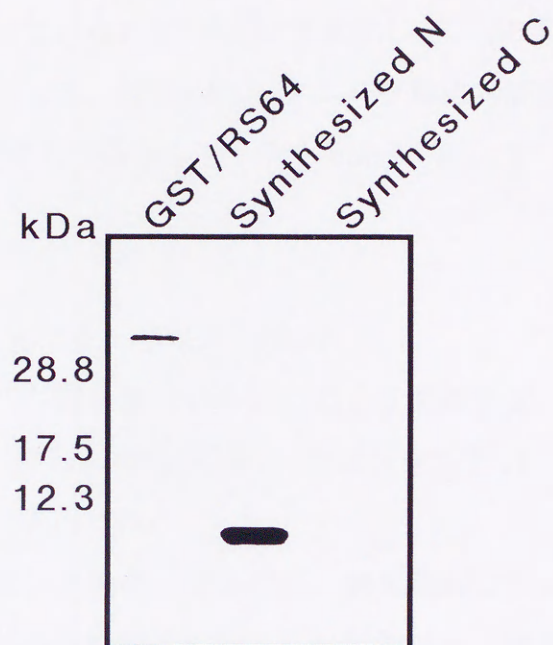


Fig. 23. Immunity of monoclonal antibody.
 The proteins were electrophoresed 18% SDS-PAGE, and electro-
 transferred to PVDF membrane. The protein blot was reacted with
 diluted monoclonal antibody (1:250). The proteins loaded in the gel
 are indicated upper lanes. Molecular weight markers are indicated on
 the left.

BIS濃度SDS-PAGEによってタンパク質の分離を行い、ウエスタンブロット後、モノクローナル抗体処理をし、ECL法によって相同タンパク質の検出を行った結果、全ての菌株から大きさ約12kDaのバンドが検出された (Fig. 24)。よって、このタンパク質は、プラスミドからではなく、ゲノム上の相同配列から発現したものと考えられた。

プラスミドを保持していない1271菌株を供試して、12kDaのタンパク質の発現量の経時変化の検討を行った。約12kDaのタンパク質は培養3日目から検出されはじめ、培養7日目まで安定して存在していた (Fig. 25)。

6) 培養濾液から相同タンパク質の検出

培養濾液中のタンパク質を冷アセトンによって沈殿させ、Low-BIS濃度SDS-PAGEによってタンパク質の分離を行い、ウエスタンブロット後、ECL法によって相同タンパク質の検出を行った。

泳動後のゲルをクマシー染色したところ、菌を接種していない培地中のタンパク質とは異なるバンドが多数観察された。しかしながら、培養濾液中からは抗体と反応するタンパク質は検出されなかった (Fig. 26)。

7) 細胞分画で得られた画分から相同タンパク質の検出

(1)細胞壁画分の検討

第IV章1節5) 項でTotal タンパク質中に見いだされたRS64と相同性があると考えられるタンパク質 (相同タンパク質) の解析を進めるために、タンパク質の発現が安定していた1271菌株を供試して細胞分画法により局在性を検討した。相同タンパク質が可溶性画分にあるのか不溶性画分にあるのかについて検討したところ、不溶性画分から抽出したタンパク質中に抗体と反応するバンドが見いだされたが、可溶性画分にこのタンパク質は見いだされなかった (Fig. 27)。また、本タンパク質は低速・短時間の遠心 (1,000×g、5分間) で得られる画分でも同程度のシグナルとして見いだされた。このことから、相同タンパク質は細胞壁画分に局在している可

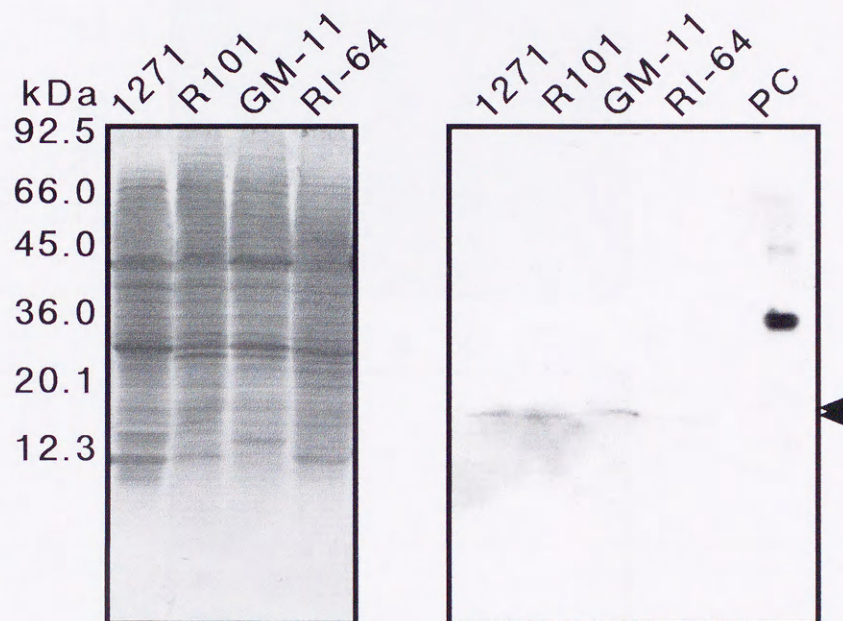


Fig. 24. Immunodetection of the homologous protein to RS64 from total proteins of AG4 isolates.

(A) Coomassie blue-stained SDS-PAGE containing total fungal proteins AG4.

(B) Western analysis of a gel identical to that (A). Total protein were electrophoresed in 18% SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane for Western analysis. Blot was probed using monoclonal antiserum raised against RS64. Upper lanes indicate the fungal isolates. Molecular weight markers are indicated on the left. PC indicates positive control. The homologous proteins about 12kDa is indicated with arrows.

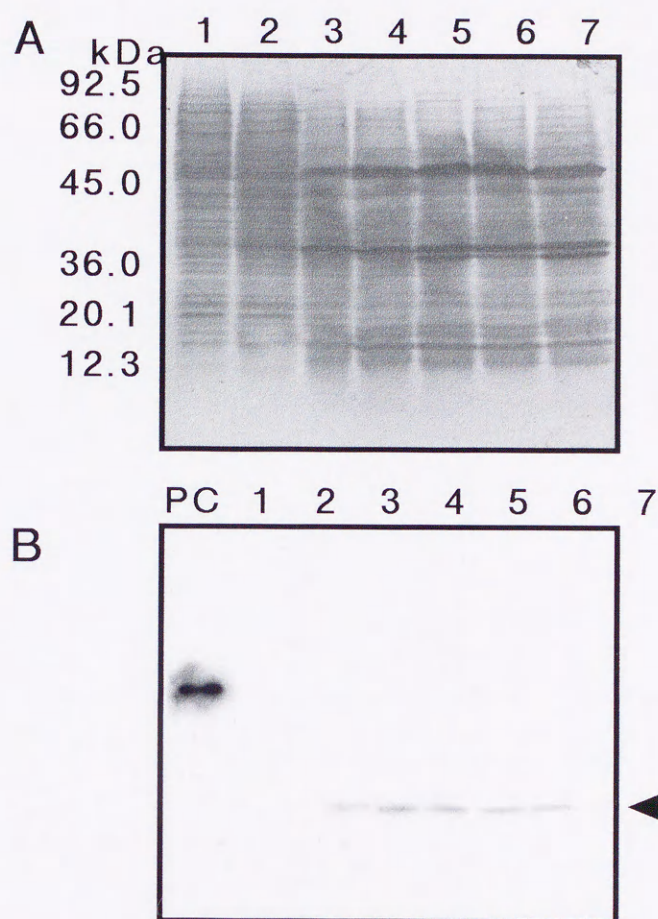


Fig. 25. Immunodetection of homologous protein to RS64 from total proteins of 1271 isolate

(A) Coomassie blue-stained SDS-PAGE containing total fungal proteins AG4.

(B) Western analysis of a gel identical to that (A). Total proteins were electrophoresed in SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane for Western analysis. Blot was probed using monoclonal antiserum raised against RS64. Lane numbers indicate days after inoculation. Molecular weight markers are indicated on the left. PC indicates positive control. The homologous protein about 12kDa is indicated with arrow.

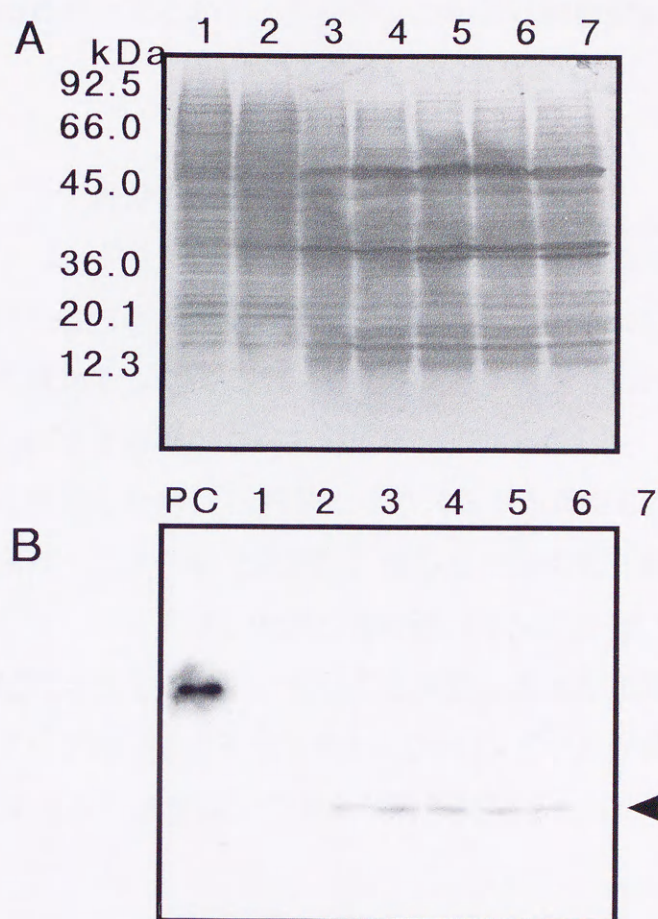


Fig. 25. Immunodetection of homologous protein to RS64 from total proteins of 1271 isolate

(A) Coomassie blue-stained SDS-PAGE containing total fungal proteins AG4.

(B) Western analysis of a gel identical to that (A). Total proteins were electrophoresed in SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane for Western analysis. Blot was probed using monoclonal antiserum raised against RS64. Lane numbers indicate days after inoculation. Molecular weight markers are indicated on the left. PC indicates positive control. The homologous protein about 12kDa is indicated with arrow.

能性が考えられた。

菌糸を完全に破碎し、細胞質成分を洗い流し、さらに2%Triton-X100で膜成分を溶出した細胞壁画分について検討した (Fig. 28)。得られた細胞壁画分に12kDaのシグナルが検出されたことから、相同タンパク質は細胞壁に局在していると考えられた。

(2)ミトコンドリア画分の検討

pRS64はミトコンドリア内在性であることから、RS64が発現している場合、ミトコンドリアに局在している可能性が考えられた。しかしながら、可溶性画分と不溶性画分に分けて検討をしたところ、ミトコンドリアが含まれていると考えられる可溶性画分からシグナルは検出されなかった。

プラスミドを保持しない1271菌株とプラスミドを保持したRI-64菌株を供試して、菌体を等張バッファー中で破碎し、遠心して細胞壁・核などのオルガネラを除いた画分からミトコンドリアを多く含む画分を沈殿させ、さらに1M~2Mサッカロース密度勾配によってミトコンドリアを精製した画分を得て検討した。両菌株の精製ミトコンドリア画分から大きさ約15kDaのシグナルが検出されたことから (Fig. 29)、本タンパク質はプラスミドから発現したものではないと考えられた。

8) 酸-アルカリによる相同タンパク質の選択的可溶化

細胞壁画分から12kDaのタンパク質を可溶化できる界面活性剤としては2%SDSが有効であったが、SDSで溶出を行った場合、2D-PAGEでスポットを単離することができず、目的外のタンパク質も大量に可溶化されてくることから、その後の解析が困難であった。そこで、SDSを用いず選択的に可溶化する方法を検討した。

膜組織除去後の細胞壁画分を0.5M HClで処理することによって選択的な可溶化が可能であった。可溶化後のHClを0.5M NaOHでただちに中和し、トリクロロ酢酸によってタンパク質を沈殿させ回収した。回収したタンパク質と可溶化後に細胞壁中に残ったタンパク質について検討したところ、選択的に12kDaのタンパク質が可溶化されているのが観察された。また本方法で抽出したタンパク質の抗原性は失われ

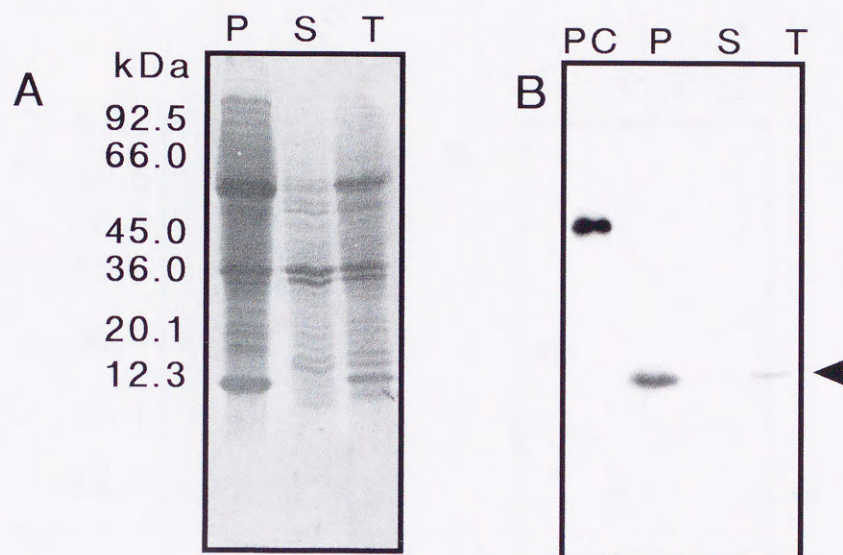


Fig. 27. Immunodetection of homologous protein to RS64 from rough fractionated cellular components.

(A) Coomassie blue-stained SDS-PAGE gel.

(B) Western analysis of a gel identical to that (A). Proteins were electrophoresed in SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane for Western analysis. Lane P, Precipitation including cell wall and microorganela; lane S, supernatant including soluble proteins and a little membrane and lane T, total proteins. Molecular weight markers are indicated on the left. PC indicates positive control. The homologous protein about 12kDa is indicated with arrow.

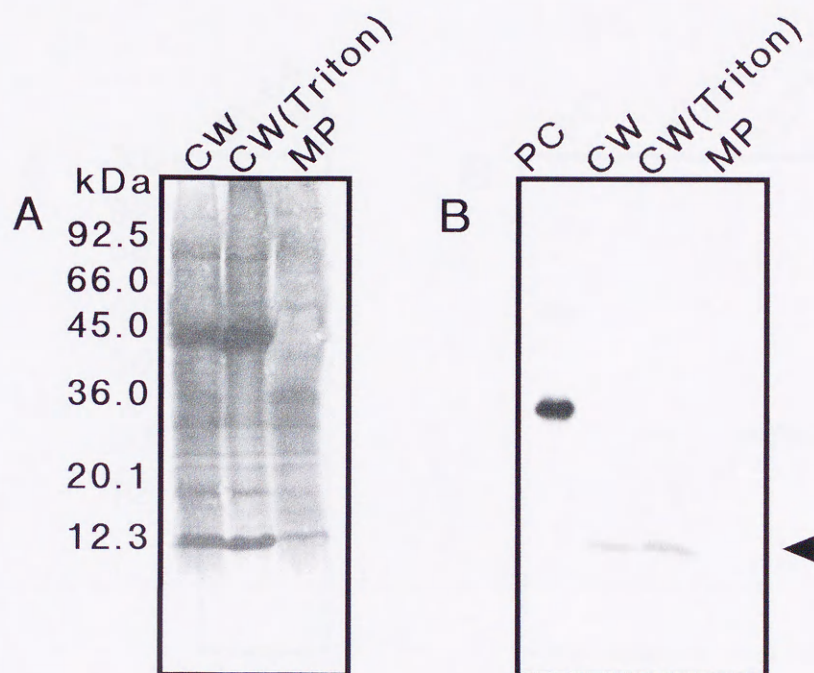


Fig. 28. Immunodetection of the RS64 homolog from cell wall fraction and that removed membranes.

(A) Coomassie blue-stained SDS-PAGE gel.

(B) Western analysis of a gel identical to that (A). Proteins were electrophoresed in SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane for Western analysis. Lane CW, crude cell wall fraction ; lane CW (Triton), solubilized membranes from CW fraction by treating 2% Triton X-100 ; and lane MP, membrane proteins solubilized from CW. Molecular weight markers are indicated on the left. PC indicates positive control. The homologous protein about 12kDa is indicated with arrow.

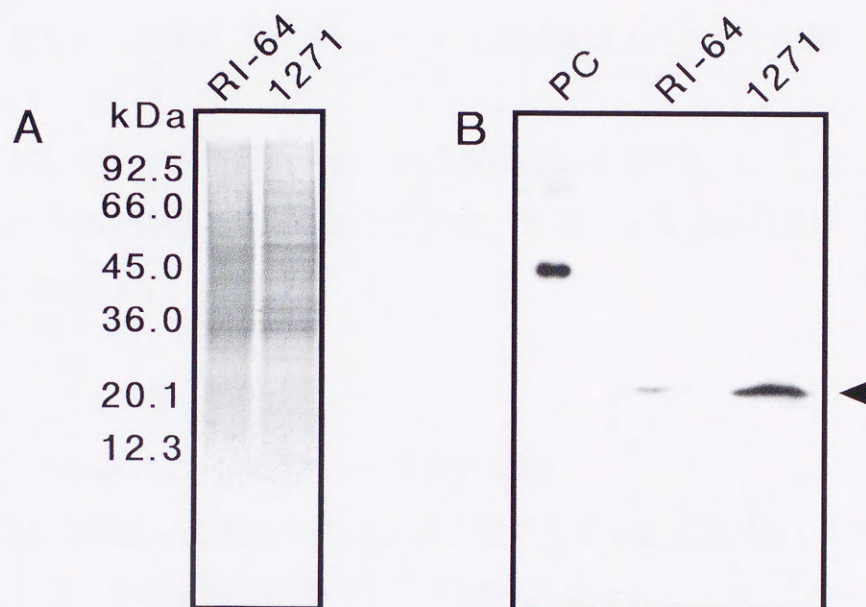


Fig. 29. Immunodetection of homologous protein to RS64 from mitochondrial fraction.

(A) Coomassie blue-stained SDS-PAGE gel.

(B) Western analysis of a gel identical to that (A). Proteins were electrophoresed in SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane for Western analysis. Lane RI-64, mitochondrial fraction from RI-64 isolate; and lane 1271, mitochondrial fraction from 1271 isolate. Molecular weight markers are indicated on the left. PC indicates positive control. The homologous protein about 14kDa is indicated with arrow.

ていなかった (Fig. 30図)。

9) 糖鎖の付加解析

抗体と反応したタンパク質は細胞壁に存在している可能性が予想された。細胞外に存在するタンパク質のほとんどは何らかの修飾を受けていることから、細胞壁画分タンパク質をPVDF膜にブロットし、シッフ試薬による染色で糖鎖の有無を検討した。

糖鎖の付加していると思われるタンパク質は赤く染色されたが、12kDaの相同タンパク質は本方法では染色されなかったため、糖鎖による修飾は受けていないと考えられた (Fig. 31)。

10) 2D-PAGEによる相同タンパク質の単離

酸-アルカリで抽出した相同タンパク質の性状を解析するために、Lysis バッファで可溶化して、等電点電気泳動で18~20時間泳動を行った後、Low BIS濃度 SDS-PAGEで2次元的に展開して単一スポットに分離することを試みた。

12kDaの相同タンパク質はpI 11付近に単一スポットとして検出された (Fig. 32)。

11) 相同タンパク質のアミノ酸配列と解析

2D-PAGE後のゲルをPVDF膜にブロットし、CBB染色によってタンパク質を染色し、風乾後、12kDaのスポットを切り出してアミノ酸シーケンスに供した。しかし、アミノ酸の明確なピークは得られなかったため、N末端側は何らかの修飾を受けていると考えられた。

2D-PAGE後、ゲルをCBB染色してスポットを切り出し、Tricine SDS-PAGEの濃縮ゲル中でProtease Kによってタンパク質の断片化を行った。泳動後のゲルはPVDF膜にブロットし、CBB染色によってタンパク質を染色した (Fig. 33)。相同

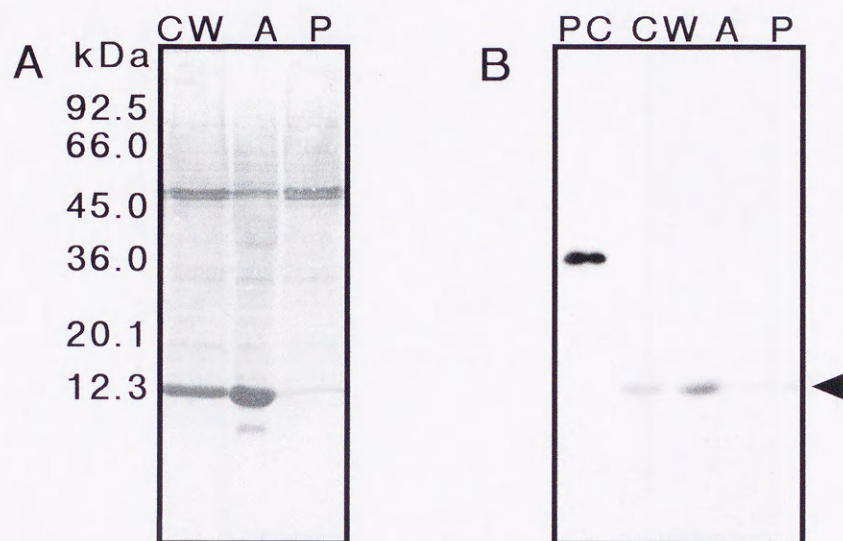


Fig. 30. Acidic extraction of homologous protein of RS64 from cell wall fraction .

(A) Coomassie blue-stained SDS-PAGE gel.

(B) Western analysis of a gel identical to that (A). Proteins were electrophoresed on SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane for Western analysis. Lane CW, Cell wall fraction; lane A, extracted proteins from CW by treating 0.5M HCl; lane P, the remained proteins in CW after treatment of HCl. Molecular weight markers are indicated on the left. PC indicates positive control. The homologous protein about 12kDa is indicated with arrow.

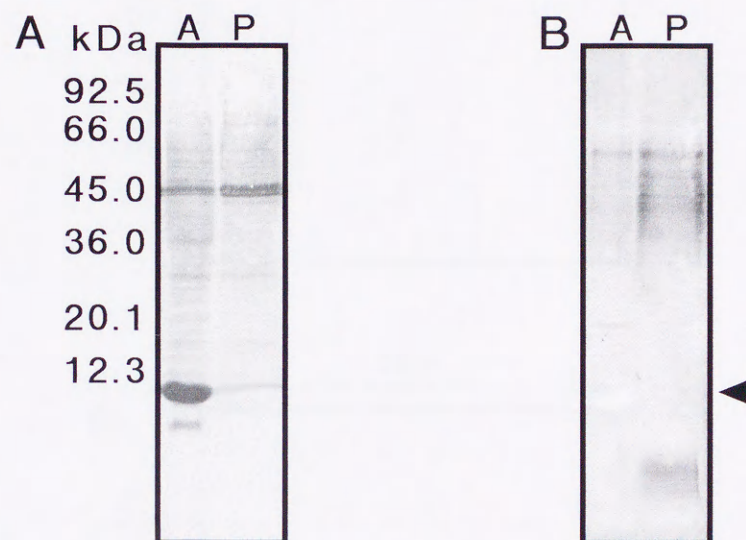


Fig. 31. Sugar chains detection by schiff staining.

A: CBB stained PVDF membrane that has blotted SDS-PAGE gel.

B: Schiff stained PVDF membrane

Lane A, the homologous protein to RS64 by extracted HCl treatment; and lane P, the remained proteins in cell wall after treatment of HCl. Molecular weight markers are indicated on the left. The homologous protein to RS64 is indicated with arrow. This protein has not stained by schiff staining.

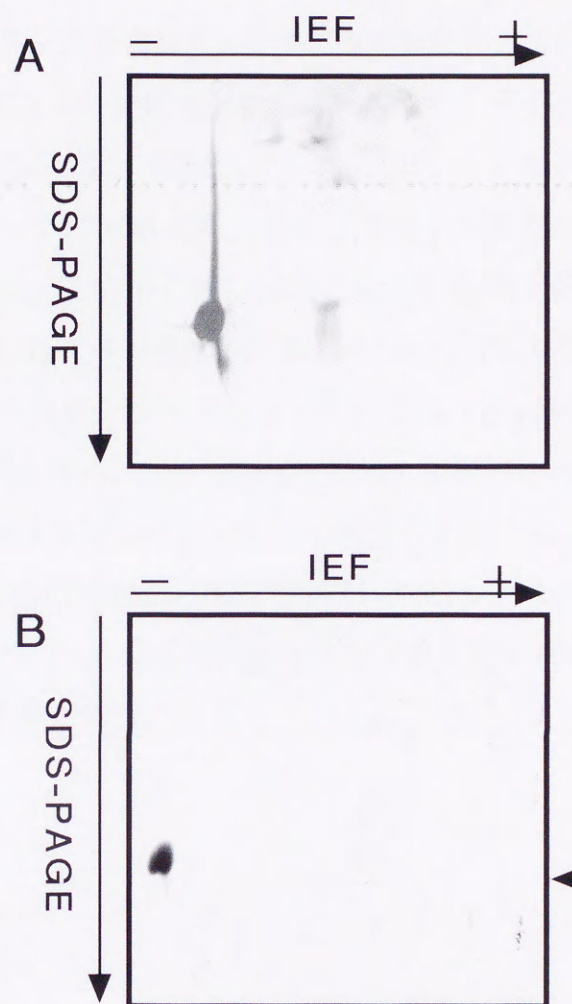


Fig. 32. Purification of the homologous protein to RS64 by 2D-PAGE. (A) Coomassie blue-stained 2D-PAGE gel. (B) Western analysis of a gel identical to that (A). The extracted protein from CW fraction by treatment with 0.5N HCl were loaded onto an isoelectric focusing tube gel. After electrofocusing, the tube gel was mounted onto SDS-PAGE gel, electrophoresed and transferred to PVDF membrane for Western analysis. The homologous protein about 12kDa is indicated with arrow.

タンパク質はProtease Kを20 μ g加えても完全に断片化は行われなかった。

Protease Kを100 μ gに増加しても断片化の効率は変わらなかったため、20 μ gで行った。

断片化後の相同タンパク質は3つのサイズに断片化していると考えられたが、最も小さい断片はさらに3つのスポットからなっていた。それぞれのスポットを上から digested 12kDa/①、/②、/③として、切り出し、アミノ酸シーケンスに供した (Fig. 31)。digested 12kDa/①、/②のスポットから得られた7アミノ酸の配列は全く同じであったが、ここから得られたアミノ酸配列はRS64と共通な配列を含んでいなかった。得られたアミノ酸配列に関してFASTAによりデータベース中の既知のタンパク質とのホモロジーサーチを行ったところ (Fig. 34)、digested 12kDa/①、/②はショウジョウバエのprofilinと83%の相似性を示した。また/③のスポットの7アミノ酸についてホモロジーサーチを行ったところ、この領域もヒトの profirinと85.7%の相似性を示した。BLAST searchではホモロジーのあるタンパク質は見いだされなかった。C末端側からアミノ酸配列の解析を試みたところC末端側の4アミノ酸配列が得られた。

考察

本章ではAG4に属する1271 (プラスミドを保持していない)、R101 (pRS64-1)、GM-11 (pRS64-2)、RI-64 (pRS64-1、-2、-3) の4菌株を供試して、AG4の保持するプラスミド、pRS64の宿主の表現型に与える影響について検討を行うため、pRS64にコードされた新規タンパク質 (RS64) と相同性をもつタンパク質の検出と細胞内での局在性、さらにアミノ酸配列の相同性について検討した。

大量培養後の生菌体重の経時変化は4菌株とも培養開始後2~4日目で急激に増加し、その後定常状態となった。定常状態に達したときの菌体重は1271、GM-11、R101の間では大きな差は認められなかったが、RI-64菌株は少なかった。これは

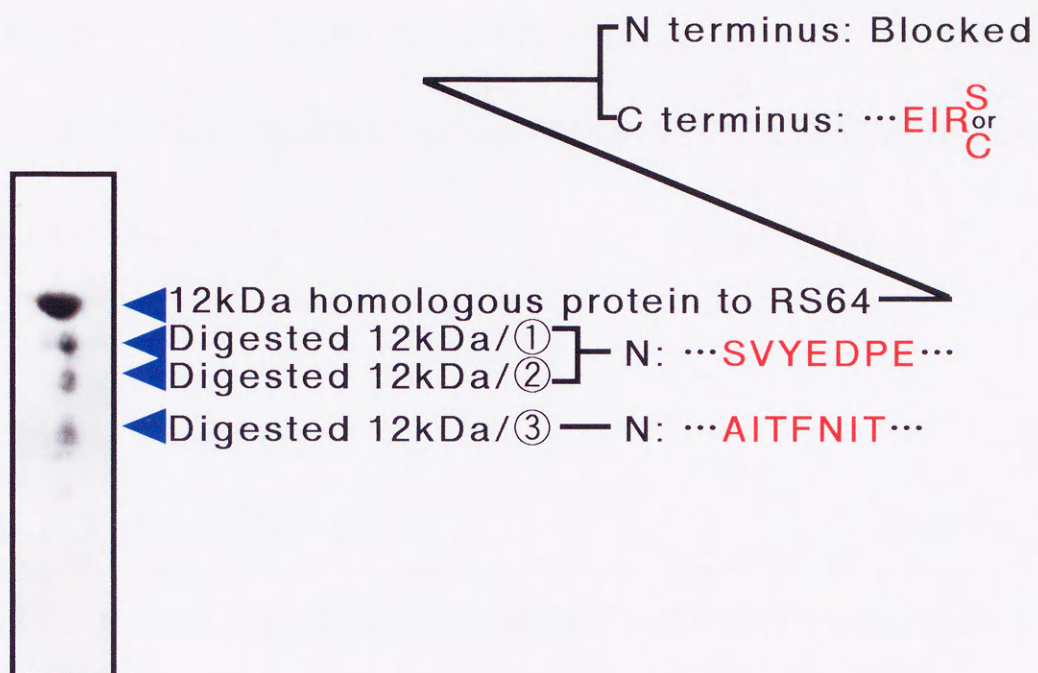


Fig. 33. Peptide mapping of 12kDa homologous protein to RS64 and amino acid sequences.

Twelve kDa homologous protein was separated by 2D-PAGE and digested with protease K in stacking gel of tricine SDS-PAGE. After electrophoresis, the gel was transferred to PVDF membrane and stained with Coomassie blue.

DRME PROFILIN (CHICKADEE PROTEIN). (126 aa)

70	80	90	100	110
IYLSGTDRVVRAKLGRSGVHCMKTTQAVIVSIYEDPVQPQQAA				
				: : : : :
Digested 12kDa/① and ②				SVYEDPE

PRO1_BOVIN PROFILIN I. (139 aa)

70	80	90	100	110
LGGQKCSVIRDSLLQDGEFTMDLRTKSTGGAPT FNITVTMTAKTL				
				: : : : :
Digested 12kDa /③				AITFNIT

Fig. 34. Homology search results by FASTA.
 Upper: Amino acids sequence of digested 12kDa/①and②.
 Lower: Amino acids sequence of digested 12kDa/③

RI-64菌株が培地中にシュウ酸を産生し、自身がダメージを受けたためと考えられた。

pRS64がコードしているORF領域からの転写RNAについて検討を行ったところ、プラスミドを保持する3菌株からは0.5kbのORF領域を含む相同RNAが検出された。このRNAはサンプリングを行った期間を通じて、抽出したRNA中に一定量で検出され、増減は認められなかった。培養2～4日目には菌体重が急激に増加していることから、菌体重の増加と同調的にRNAの転写速度が増加しているか、プラスミドあたりのRNA転写量は変化せず、生菌体重の増加にあわせてプラスミドが複製していると考えられた。また、洗浄条件を弱めた場合、pRS64と相同性のある1.2kbの転写物がプラスミドを保持していない1271菌株を含む4菌株から検出された。このことから、1271菌株はpRS64をわずかに菌体中に保持しているか、AG4に属する菌株は、相同性は低い、pRS64のORF領域とホモロジーのある配列をゲノム上に保持している可能性が考えられた。

プラスミドを保持していない1271菌株を供試して、サザン解析によりゲノム上のpRS64との相同配列の有無を検討した。洗浄条件を弱めた場合、ハイブリダイズするバンドが存在した。このことから、AG4に属する4菌株から検出された1.2kbの転写物はゲノム上に存在する相同配列から転写されている可能性が示唆された。

pRS64上のORFを大腸菌内で大量発現させ、抗体を作製し、AG4に属する4菌株を供試して菌体からのタンパク質の検出を試みた。全タンパク質から検出を行ったところ、供試した4菌株とも12kDa付近に抗体と反応するバンドが検出された。GM-11菌株は他の3菌株よりもやや大きい14kDaのバンドが検出された。RI-64菌株は他の菌株と比較して検出されたシグナルは弱かった。このことはシュウ酸により菌体がダメージを受け、タンパク質が分解しているか、発現量が少ないためと思われた。プラスミドを保持している菌株、いない菌株ともに抗体と反応するバンドが検出されたことから、このバンドはプラスミドを保持する菌株で検出された0.5kbの相同RNAから翻訳されたものではなく、むしろゲノム上にある相同配列から翻訳された産物である可能性が高いと考えられた。そこで、プラスミドを保持していない1271菌株を供試し、抗体と反応した相同タンパク質の発現量の経時変化について検討した。本タンパク質は培養2日目から検出され、4日目で安定し、5日目

以降一定量で検出された。1.2kbの相同なRNAは培養2日目で検出され、3日目で最大となり、4日目で消失してしまうことから、相同タンパク質が検出されはじめ、増加する時期と、相同RNAが転写されはじめ、増加する時期の間には相関があると考えられた。RNAが検出されなくなる5日以降でも、本タンパク質は検出されたことから、本タンパク質は発現後は安定して存在していると考えられた。また本タンパク質の増加は生菌体重の増加とも一致していた。

1271菌株で検出された相同タンパク質の性状及びpRS64にコードされたタンパク質との相同性について検討を行うためには、本タンパク質を何らかの方法で精製する必要があると考えられた。全タンパク質中から検出された相同タンパク質のシグナルは微量であったことから、まず抽出タンパク質中における相同タンパク質の濃度を高めるため、また局在性からその機能を推定するために、細胞分画法を用いて、本タンパク質の局在性について検討した。相同タンパク質は膜成分の溶出に用いられる最も一般的な非イオン性界面活性剤の1つである2% Triton X-100で処理した細胞壁画分中に存在していたことから、細胞壁に局在している可能性が示唆された。また細胞壁画分から相同タンパク質を溶出するには最も強力な界面活性剤であるSDSを用いるか、あるいは0.5N HClで処理する条件を用いなければならなかったことから、相同タンパク質の結合はかなり強固であると考えられた。RS64の予想分子量は7kDaと推定されているが、検出されたタンパク質は12kDaと大きかった。細胞外のタンパク質の98%が糖鎖の修飾を受けていることから相同タンパク質が糖鎖の修飾を受けているか検討するため、Triton X-100により膜画分を除去した細胞壁画分からタンパク質を抽出して、シッフ染色により糖鎖を結合したタンパク質を染色した。相同タンパク質のバンドが染色されなかったことから、本タンパク質は糖鎖の修飾を受けていないと考えられた。

pRS64はミトコンドリア内在性であることから、プラスミドからRS64が発現しているならば、このタンパク質はミトコンドリアに局在している可能性が考えられた。そこでプラスミドを持たない1271菌株と、プラスミドを保持しているRI-64菌株を供試し、細胞分画法によりミトコンドリア画分を分画して相同タンパク質の検出を試みた。本画分からは15kDaのタンパク質が検出されたが、これは1271、RI-64菌株のどちらからも検出されたため、検出されたタンパク質はプラスミドと直接

関係はないと考えられた。

相同タンパク質の単離は1次元目に等電点電気泳動を行い、2次元目にLow BIS濃度SDS-PAGEを行う、2D-PAGEによって行った。相同タンパク質はpI11付近に単一スポットとして検出された。RS64は等電点が10.5と予想されていることから相同タンパク質とRS64はアミノ酸配列において何らかの類似性がある可能性が示唆された。

相同タンパク質とRS64の相同性を直接検討するために、2D-PAGEで単離された本タンパク質をPVDF膜にブロットし、アミノ酸シーケンサーによるN末端の解析を試みた。しかし、十分なタンパク量を供試しても、明確なピークは得られなかったことから、本タンパク質のN末端は何らかの形でブロックされていると考えられた。次にタンパク質分解酵素で相同タンパク質の部分分解を行い、内部配列の解析を試みた。相同タンパク質は大きく3つのスポットに分解されたが、上2つのスポットのN末端配列は全く同じであったことから、これらスポットはC末端側の分解で生じたか、相同タンパク質の内部に繰り返し配列があると考えられた。内部配列中にはRS64から予想されたアミノ酸配列は認められなかった。FASTAによって既知のタンパク質とのホモロジー検索を行ったところ、細胞内骨格であるアクチンの脱重合を阻害するprofilinと高い相同性を示した。本実験で検出された相同タンパク質は糖鎖修飾を受けていないため、インタクトな大きさが12kDaであると考えられ、これはほぼこれまでに報告されたprofilinの大きさ（12～14kDa）と一致する。しかし一般的にprofilinは等電点を5～7.5付近に持つことから、相同タンパク質の等電点とは一致しなかった。相同タンパク質の部分分解によって解析された内部配列中にはRS64のアミノ酸配列が認められなかったが、抗RS64抗体と反応したことから相同タンパク質は内部にRS64と相同な配列が存在している可能性は否定できない。また検出された相同タンパク質が*R. solani*のprofilinであるならば、なぜこのタンパク質が抗RS64抗体と反応したのかを全アミノ酸配列を決定した上で検討する必要がある。今後は得られたアミノ酸配列からプライマーを構築して相同タンパク質が何であるかを決定した上でRS64との相同性を明らかにすると共に、プラスミドを保持していない1271菌株から検出された相同DNAに関して検討を行うことによって、pRS64と宿主である*R. solani*の関係が明かになってくるものと期待される。

2. 菌糸融合第2群2型 (AG2-2) の解析

AG2-2に属する菌株のうち、本研究ではH-16 (pRS224-1、-2、-3) とBV-3 (プラスミドを保持していない菌株) を供試して検討した。AG2-2の保持するプラスミド、pRS224の構造と転写物、並びにコードされたORFはFig. 35~37図に示した (桂1997より改変し抜粋)。

1) 菌体重の経時変化

菌体はPD培地で前培養後、ホモジナイズしてPPD培地に接種し、経時的にサンプリングして、1シャーレあたりの生菌体重として測定した (Fig. 38)。

2) 相同RNAの検出

経時的にサンプリングして凍結保存した菌体からTotal RNAを抽出し、グリオキサル変性下で泳動を行い、ノザンブロットイング後、DIG標識されたプローブで検出を行った。Total RNAは20 μ g泳動し、プローブは桂 (1997) によって予想されたプラスミド上のORF部位を約800bpずつ3等分し、クローニングした中央部のRS224-bを用いた (第40図)。

プラスミドを保持するH-16菌株からはサンプリングを行った全ての期間において7.4kbと4.7kbの相同RNAが見いだされたが、プラスミドを保持していないBV-3菌株からは相同RNAは全く検出されなかった (第39図)。

3) pRS224のORFにコードされたタンパク質の発現

pRS224にコードされたタンパク質の菌体内での発現を検討するため、本タンパク質の大量発現を試みた。ORF領域のクローニングには増幅鎖の両端にBamHIリンカーをつけるプライマーを構築して、pRS224をテンプレートとし、PCR反応によってORF領域を増幅した。BamHI処理後、クローニングベクターpUC 19あるいは発



Fig.35. The presumed of transcription from pRS224 by northern analysis using digested fragment of pRS224 .

Two transcripts (7.4 and 4.7kb) were detected in mycelial cells of the H-16 isolate. The 7.4kb transcript will be generated from the left complementary chain ("-" strand), and f all along sense chain ("+" strand) , to the right complementary chain ("-" strand). The 4.7kb transcript will be generated from the center region of sense chain ("+" strand) to the right complementary chain ("-" strand).



Fig. 36. Expected open reading frames(ORF) in pRS224-1 using ORF finder softwear in GenomeNET. Indicated ORFs are more larger than 50aa. The green and red boxes are coded on sense chain (+ strand), and the blue boxes are complemental chain (- strand). The longest ORF(RS224) is indicated red box.

MKKLLRQIQHNLLPQLAVGDTVVDKLHKGSSSELIGGNLGSIRASLR
QLQNEGKFRSKTLYLPNISKFKIGLGEVNPLLYAGGIFTRYGSKRV
MTIGPNSRANRYLAYMYKRMQLDENKRRCLSKVLSSFIRRSNSY
LIAVLFSIDKNLYRERSMKFTLDLIKSINYLRGYDVSFKVVNRLQAT
GDLYNVMFHMIDYYRAYIPKPGTNKVRPLGVPTLPWRIYMKMFLIP
LQLQLDSGSFQHG FVPRRGTLTCWNAMSNTVLKSKNILEVDFKGF
FPSVSAINLTVILGELGILPGPLIRFLHSMNESKPFFRFRWRPLQREVI
LTTMRMYSIMEEIVKYFERRHAGLLERFYQFHSEFGKTAIWARPQE
PKYWFEKIFSESFFIAHGWINLPSMGEKLRFLRDPSSLYKKYPHYNI
FVSLRESAYGLFNRIAELHGSTISEENFSGAQSFMAQGSNKHSLPQ
FEREDESGETESGFLVSPIENREPTSDPHLFPPFRPFGKLKWKNPFKF
KISQFGLPQGGPLSPFLSTIVLKYFVNRLKRNHPEIECLFYADDGFF
YSSNTEAFNSFLSQVDTLLKEVGIIQISFEKSLLRRYDGVCGQEIKGE
TWTSDMNTLRPIEGFSPSKSVWMKFLGLEYNWENGMLRSNTRQG
RSLTYTHKDMLIFSQVINDALKDNFLASISRNPKFPLIETLSLLYFLH
KQLLDPNKVKVQALINRFSFSFTKNQEKFLKRFLTLSNKSLLRMAN
SNLQVGLPKFLKSLKNHPVLLTSLGQLEKPLQEFPSPFGGLVQA
RLYYGSNIIKGFDTDTGSQNFNFKVSPNSVGSHLKSRSRLTTFVG
SSYGASHLLKMASSLRAPNNTPVWNSIPLKEDIIPNVFTYIPIMRQV
SETLQGMRR*

Fig.37. Deduced amino acid sequences of RS224(888aa) encoded by pRS224.

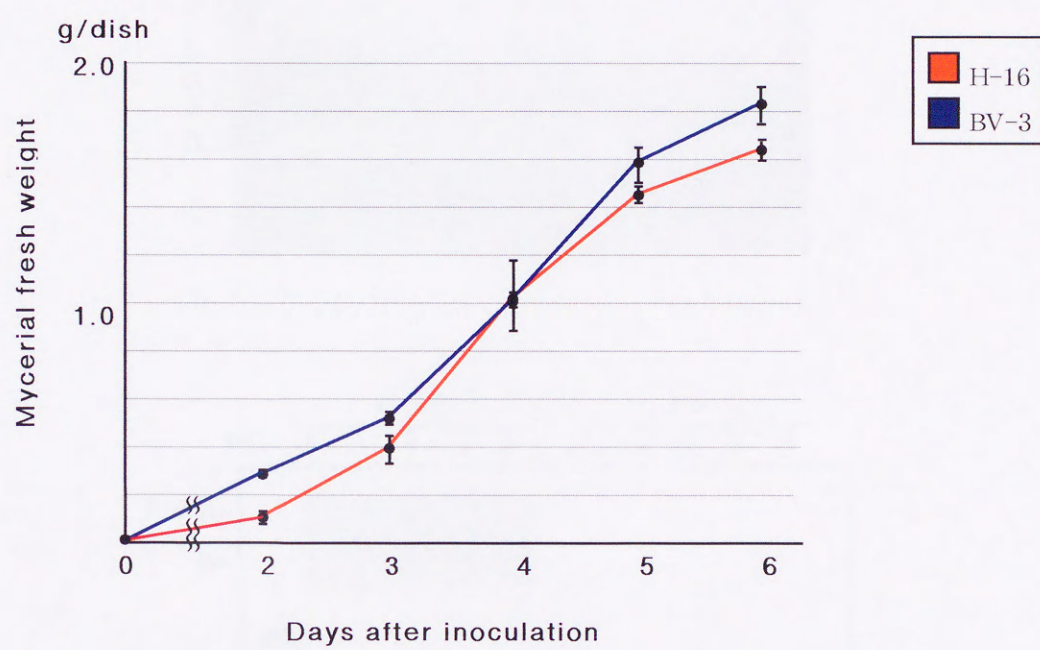


Fig . 38. Mycelial fresh weights of days after inoculation

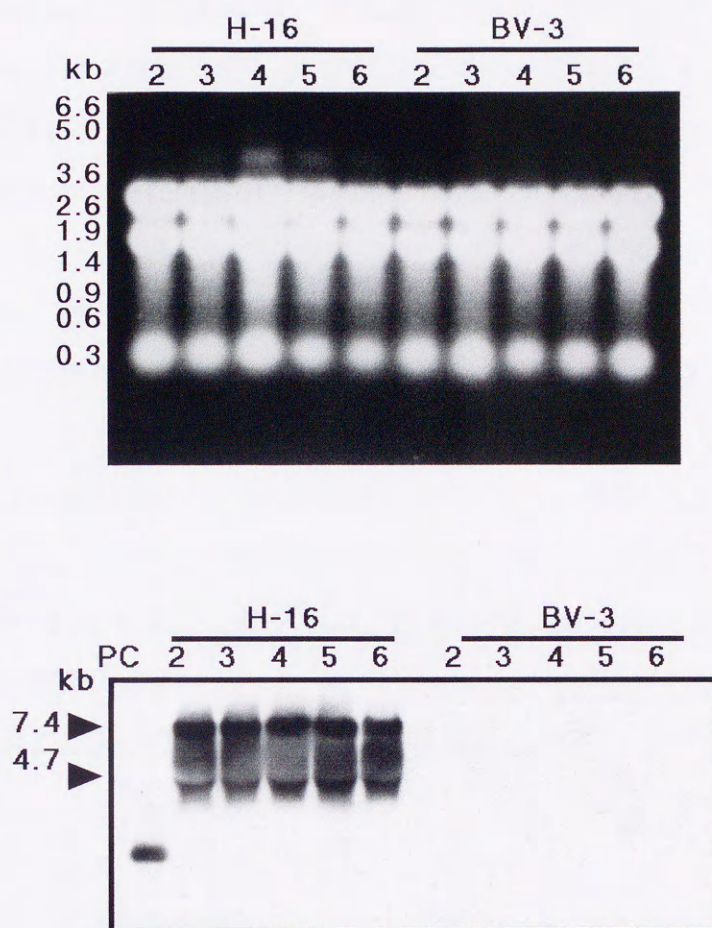


Fig. 39. Northern analysis of the total RNAs extracted from H-16 and BV-3 isolates.

(A) Total RNA from the isolate was electrophoresed and stained with etidium bromide.

(B) Total RNA from the gel in (A) was blotted onto nitrocellulose membrane and hybridized to the cloned RS224-b (Fig. 38) .

Lane numbers indicate days after inoculation. Upper lanes indicate the fungal isolates. Molecular weight markers are indicated on the left. PC indicates RS224-b probe. Position of the 7.4 and 4.7kb are indicated with arrows.

現ベクターpGX-2Tを用いて大腸菌NM522の形質転換を試みたが、形質転換が困難であり、目的のクローンは得られなかった。そこで、ORF領域を約800bpずつ3等分して、それぞれをN末端側からRS224-a、-b、-cとして（Fig. 40）、前記の場合と同様にPCR反応によってBamHIサイトを両末端に付加した断片を増幅し、pUC19を用いてクローニングを試みた。クローニング後の断片はシーケンス解析によってフレームのずれがないことを確認した上、pGX-2Tにサブクローニングして、タンパク質発現用大腸菌BL21菌株で発現を試みた。IPTGでタンパク質発現誘導後、大腸菌から抽出したTotalタンパク質をLammeliのSDS-PAGEで分離し、CBB染色を行ったところ、RS224-b、-cをクローニングした大腸菌で、目的タンパク質の予想分子量と一致した大きさのバンドの増加が認められた。発現タンパク質はグルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）との融合タンパク質として発現されるため、既存のGST認識抗体との反応を確認したところ、増幅したバンドはGST抗体によって認識された。しかし、RS224-a断片をクローニングした大腸菌からは培養温度、時間、IPTG濃度を変えてもタンパク質の発現が出来なかった。さらにRS224-a断片のN末端を約200bpディレーションしたクローン（ Δ N/RS224-a）を作製して発現を試みたが、目的分子量のタンパク質は発現しなかった。

4) 発現タンパク質の精製

破碎後の大腸菌液を遠心して可溶性画分と不溶性画分に分画し、発現タンパク質の含まれる画分に関して検討した。

RS224-b、-c共に不溶性画分に存在しており、封入体を形成していると思われた（Fig. 41）。大腸菌の培養温度（18℃～37℃）、IPTG添加濃度（0.05～0.5mM）、インダクションの時期などを変えて発現を試みたが、可溶性画分に本タンパク質を発現させることは出来なかった。また、グアニジン塩、尿素などの変性剤によって封入体を可溶化後、グルタチオンセファロース4Bで本タンパク質の回収を試みたが、回収率が悪かったため、封入体画分を直接サンプルバッファーで可溶化して、10%アクリルアミド濃度でSDS-PAGEを行い、CBB染色後バンドを切り出してエレクトロエリューションを行い、透析後風乾して精製タンパク質とした。

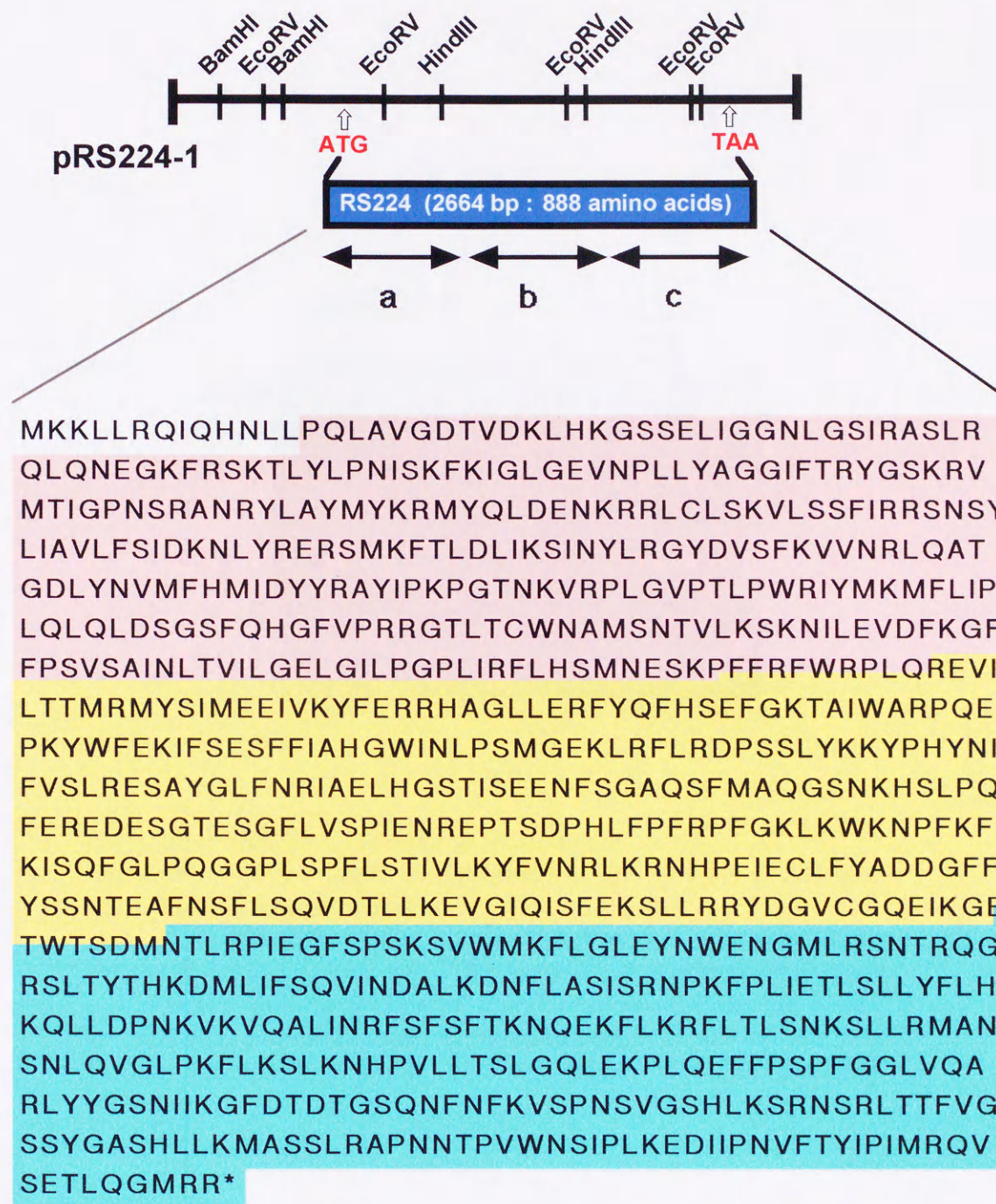


Fig.40. Amino acid sequence encoded by pRS224 and location of three fragment of RS224. RS224 was divided into three fragments. RS224-a is containing from 13th(P) to 306th(Q) amino acid (pink box), RS224-b is containing from 298th (F) to 596th(E) (yellow box) , and RS224-c is containing from 589th(E) to C terminus (blue box).

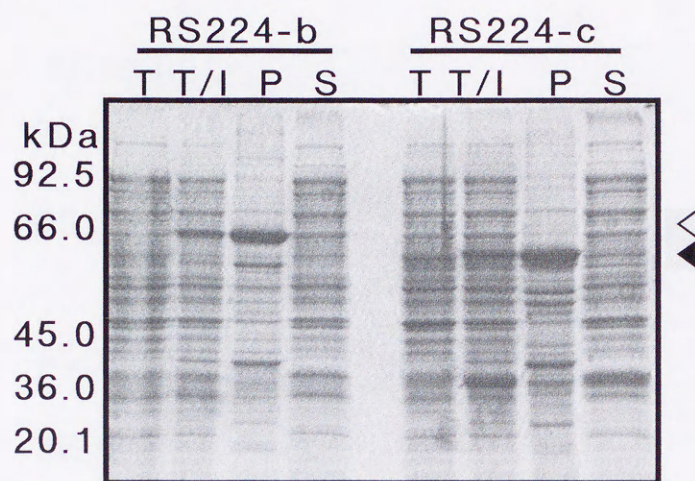


Fig. 40. Expression of fusion proteins in *E.coli*

Extracted proteins were electrophoresed in 10%SDS-PAGE and stained with Coomassie-blue.

Lane T, total protein of *E.coli*; Lane T/I, Products expressed *E.coli* from pGX-RS224-b or -c; lane P, insoluble fraction of expressed *E.coli* ; and lane S, soluble fraction of *E.coli* . Expressed fragment names are indicated lanes upper. Molecular weight markers are indicated on the left. Expressed PRS224-b (◁) and RS224-c (◼) are indicated with arrow.

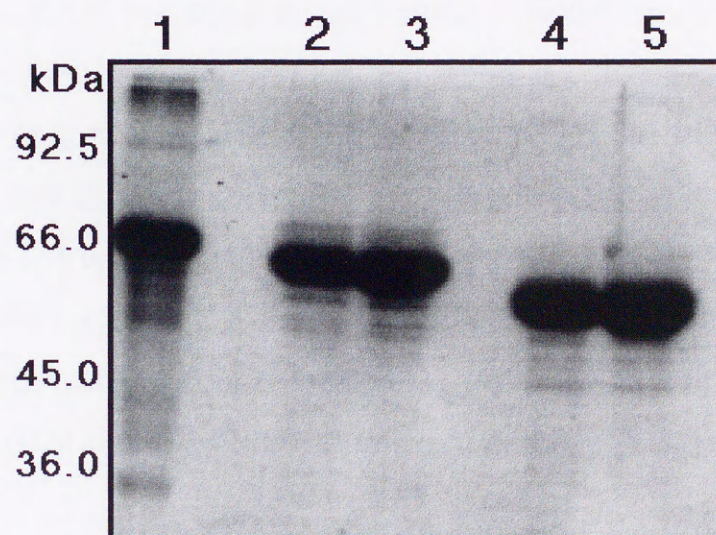


Fig. 42. Purification of RS224 fragments expressed in *E.coli*. Proteins are electrophoresed in SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. Lane 1, BSA; lane 2 and 3, RS224-b; and Lane 4 and 5, RS224-c. Each lanes are containing 10 μ g proteins. Morecular weight markers are indicated on the left.

(Fig. 42)。

5) 抗体作製と力価

精製したタンパク質は200mg/mlになるようPBSに溶解し、等量の不完全アジュバンドと混合してエマルジョンにして、マウス系統Balb/cCr (♀)の背部にタンパク量が200mgとなるように7~10日おきに皮下注射して免疫を行った。

抗原をブロットしたニトロセルロース膜を、部分採血によって得られた血清を用いて抗体処理し、発色法による検出で力価を検討した。RS224-bは3回の免疫で、RS224-cは6回の免疫で力価が十分に上昇した。抗体の収量をあげるため、同様に調製したエマルジョンを免疫タンパク量が200 μ gとなるようにマウス腹腔内に注射して3日後、全採血を行った。ここから得られた血清を用いて、同様に力価を検討したところ、発色法による検出で抗RS224-b抗体は1,000倍希釈した抗血清で0.5pgまで、抗RS224-c抗体は同様の希釈倍率で10pgまで検出が可能であった (Fig. 43、44)。

6) 全タンパク質からの相同タンパク質の検出

経時的にサンプリングして凍結保存した菌体からタンパク質を抽出して全タンパク質とし、ニトロセルロース膜に転写後、発色法によって相同タンパク質の検出を試みたが、この方法では相同タンパク質は検出されなかった。そこで、より検出感をあげるために、PVDF膜に3時間ブロット後、RS224-b、-c抗体をアフィニティ精製したものをを用いて、ECLで反応するタンパク質を検出した (Fig. 45)。

抗RS224-b抗体を用いた場合、H-16、BV-3共に63kDaのバンドが検出された。H-16菌株からは培養開始後2~6日目に約90kDaの位置にバンドが検出された。抗GST抗体ではどちらのバンドも反応しなかった。また、抗RS224-c抗体で検出を試みたところ、90kDa、63kDaのどちらのバンドとも反応を示さなかった。

7) 培養濾液から相同タンパク質の検出

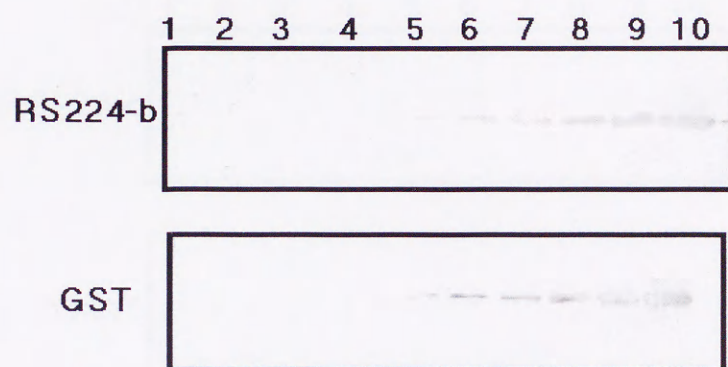


Fig. 43. Immunity of anti-pRS224-encoded protein (RS224-b) antibody.

Antibody was raised against to the RS224-b peptide. The antigen (RS224-b) was electrophoresed in SDS-PAGE, and blotted to nitrocellulose membrane. The membrane was treated with 1,000-fold diluted antiserum (anti-RS224-b is upper panel, anti-GST is lower panel) and second antibody, and detected by NBT/BCIP.

Lane 1, 0.5pg; lane 2, 1pg; lane 3, 5pg; lane 4, 10pg; lane 5, 50pg; lane 6, 0.1ng; lane 7, 0.5ng; lane 8, 1ng; lane 9, 5ng; and lane 10, 10ng of RS224-b was loaded. The anti RS224-b antiserum was detected until 0.5pg antigen.

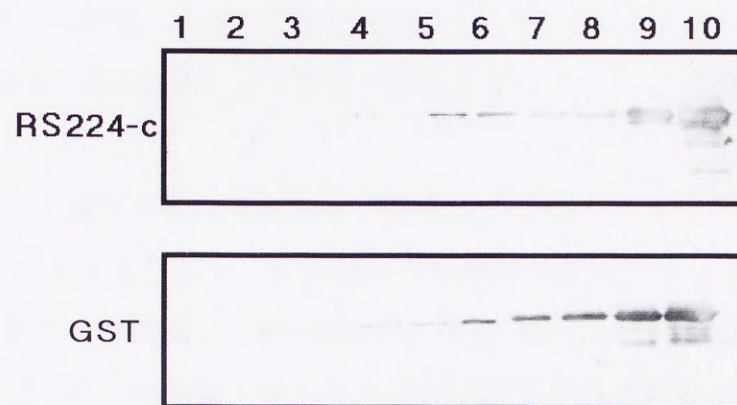


Fig. 44. Immunity of anti-pRS224-encoded protein (RS224-c) antibody. Antibody was raised against to the RS224-c peptide. The antigen (RS224-c) was electrophoresed in SDS-PAGE, and blotted to nitrocellulose membrane. The membrane was treated with 1,000-fold diluted antiserum (anti-RS224-c is upper panel, anti-GST is lower panel) and second antibody, and detected by NBT/BCIP. Lane 1, 0.5pg; lane 2, 1pg; lane 3, 5pg; lane 4, 10pg; lane 5, 50pg; lane 6, 0.1ng; lane 7, 0.5ng; lane 8, 1ng; lane 9, 5ng; and lane 10, 10ng of RS224-c was loaded. The anti RS224-c antiserum was detected until 50pg antigen.

経時的にサンプリングした培養濾液20ml中のタンパク質をTCA沈殿によって回収し、SDS-PAGE後、PVDF膜にブロットし、抗体により相同タンパク質の検出を試みた。

H-16菌株は培養4～6日目で、大きさ約30kDaの抗体と反応するバンドが検出された。BV-3菌株からはバンドは検出されなかった (Fig. 46)。

8) 細胞分画法で得られた画分から相同タンパク質の検出

H-16菌株から抽出した全タンパク質中に存在していた、抗RS224-b抗体と反応した大きさ90kDaの相同タンパク質の解析を行うために、細胞内局在性について検討した。

相同タンパク質が含まれる画分が可溶性か不溶性か検討を行うため、破碎菌液を15,000rpmで20分遠心して、上清画分と沈殿画分に粗分画して検討したところ、相同タンパク質は不溶性画分に検出された (Fig. 47)。この条件で沈殿する画分には、未破碎の細胞・細胞壁・核・ミトコンドリアが含まれると考えられることから、等張バッファーで菌体を破碎し、細胞分画法によりそれぞれの粗画分を得て、検討した。相同タンパク質は未破碎の細胞や細胞壁が含まれる1,000×gで5分遠心して得られた画分、核が含まれると思われる5,000×gで5分遠心して得られた画分、ミトコンドリアが含まれると思われる15,000×gで15分遠心して得られた画分からそれぞれ同量検出された (Fig. 48)。1,000×gで5分間遠心して得られた画分を低張バッファーで3回洗浄したところ相同タンパク質のシグナルは薄くなった

(Fig. 49)。1,000×gで5分間遠心して得られた画分を、2% Triton X-100で処理して膜成分を溶出し、得られた細胞壁画分と溶出された膜画分について検討したところ、相同タンパク質は沈殿画分から失われ、上清画分から検出された (Fig. 50)。粗ミトコンドリア画分を1M～2Mショ糖密度勾配に積層し、100,000×gで1.5時間遠心して精製ミトコンドリア画分を得、相同タンパク質の検出を試みた。H-16菌株から分画した精製ミトコンドリア画分から相同タンパク質が検出されたが、BV-3菌株からは検出されなかった (Fig. 51)。

9) 抗RS224-c抗体と検出された相同タンパク質の反応

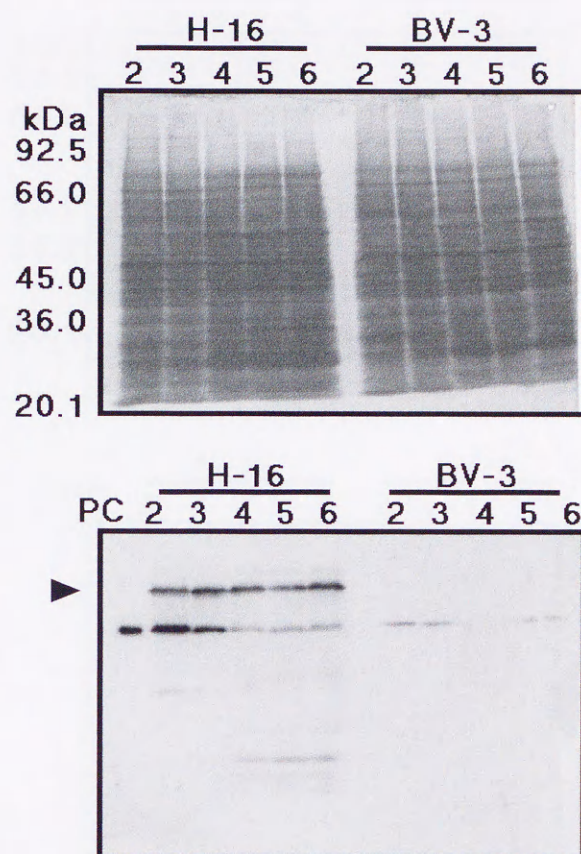


Fig. 45. Immunodetection of the homologous protein to RS224 from total proteins extracted H-16 and BV-3 isolates

(A) Coomassie blue-stained SDS-PAGE containing total fungal proteins.

(B) Western analysis of a gel identical to that (A). Total proteins were electrophoresed in 10% SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane for Western analysis. Blot was probed using antiserum raised against RS224-b. Upper lanes indicate the fungal isolates. Lane numbers indicate days after inoculation. Molecular weight markers are indicated on the left. PC indicates positive control. The homologous protein about 90kDa is indicated with arrow.

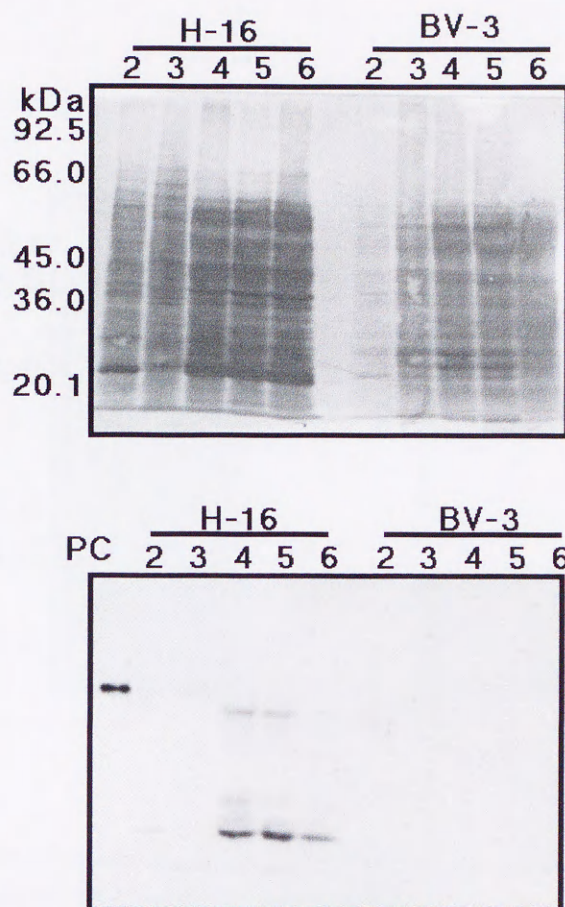


Fig. 46. Immunodetection of the homologous protein to RS224 from culture filtrate after inoculation of H-16 and BV-3 isolate.

(A) Coomassie blue-stained SDS-PAGE containing concentrated culture filtrate proteins.

(B) Western analysis of a gel identical to that (A). The proteins concentrated from culture filtrate were electrophoresed in SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane for Western analysis. Upper lanes indicate the fungal isolates. Lane numbers indicate days after inoculation.

Molecular weight markers are indicated on the left. PC indicates positive control.

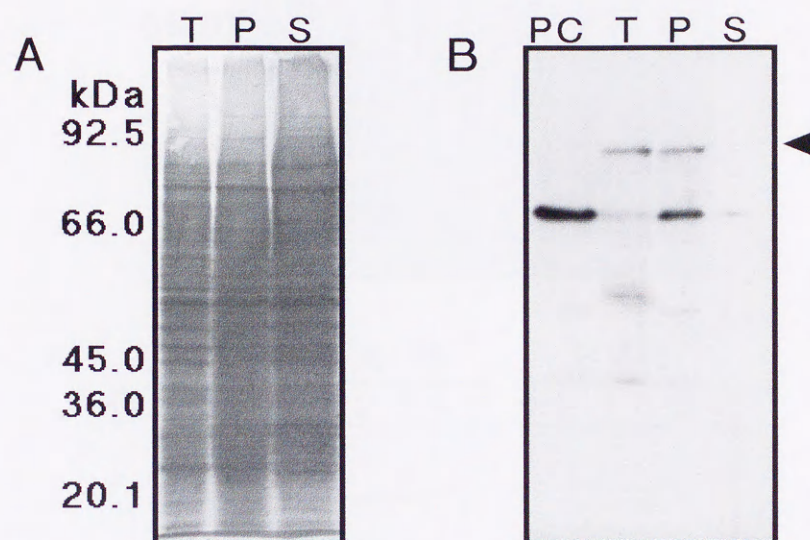


Fig. 47. Immunodetection of the homologous protein to RS224 from rough fractionated cellular components.

(A) Coomassie blue-stained SDS-PAGE gel.

(B) Western analysis of a gel identical to that (A). Proteins were electrophoresed in SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane for Western analysis. Lane T, total proteins; lane P, precipitation including cell wall and microorganela; and lane S, supernatant including soluble proteins and a little membrane.

Molecular weight markers are indicated on the left. PC indicates positive control. The homologous protein about 90kDa is indicated with arrow.

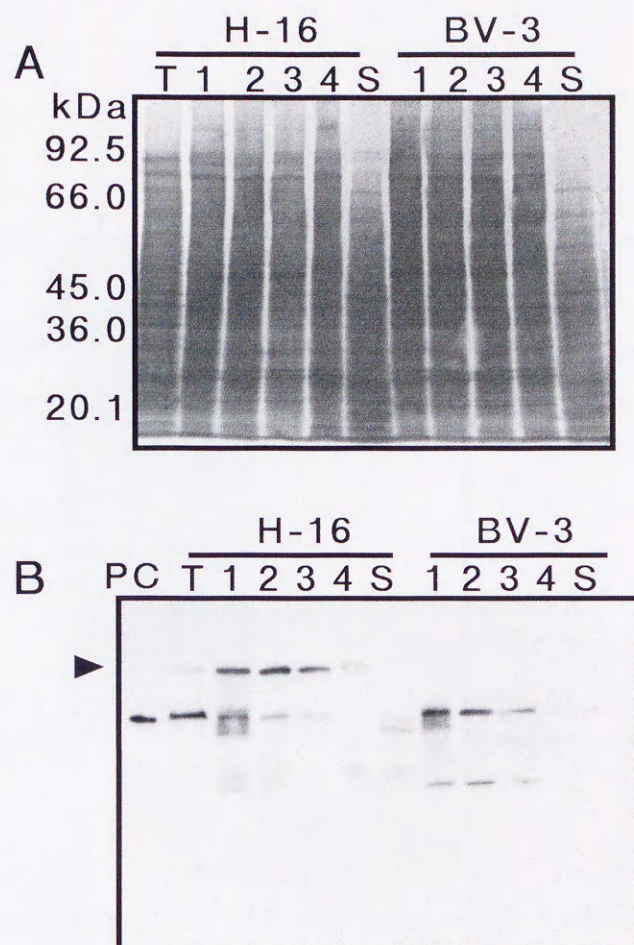


Fig. 48. Immunodetection of the homologous protein to RS224 from fractionated cell organelles.

(A) Coomassie blue-stained SDS-PAGE gel.

(B) Western analysis of a gel identical to that (A). Proteins were electrophoresed in SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane for Western analysis. Lane T, total protein; lane 1, cell wall and mycelial fraction; lane 2, nuclear fraction; lane 3, Mitochondrial fraction; lane 4, micromembrane fraction; and lane S, supernatant containing cytosolic fraction (see Fig. 2). The isolate names used in cell fractionation are indicated upper lanes. Molecular weight markers are indicated on the left. PC indicates positive control. The homologous protein about 90kDa is indicated with arrow.

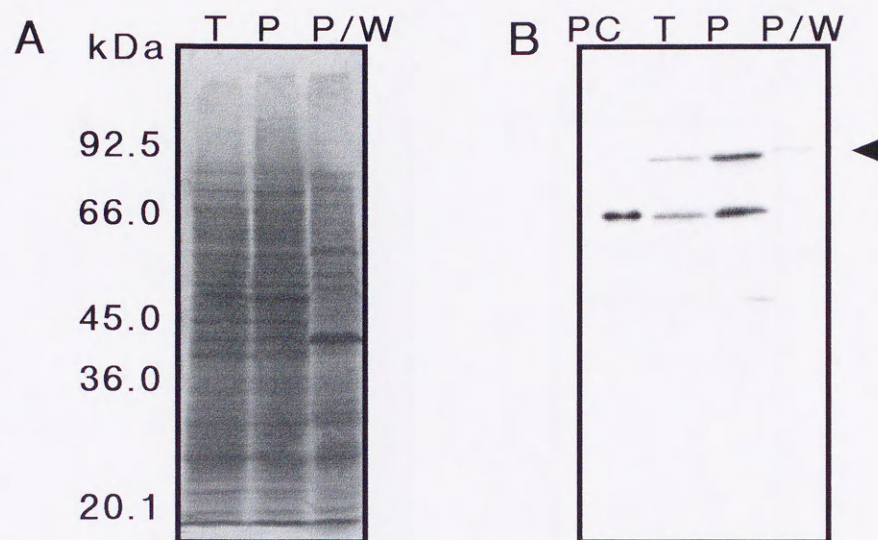


Fig. 49. Immunodetection of homologous protein to RS224 from rough fractionated cellular components.

(A) Coomassie blue-stained SDS-PAGE gel.

(B) Western analysis of a gel identical to that (A). Proteins were electrophoresed in SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane for Western analysis. Lane T, total protein; lane P, precipitation which contain cell wall and microorganela; and lane P/W, washed lane P by hyphotonic solution. Molecular weight markers are indicated on the left. PC indicates positive control. The homologous protein about 90kDa is indicated with arrow.

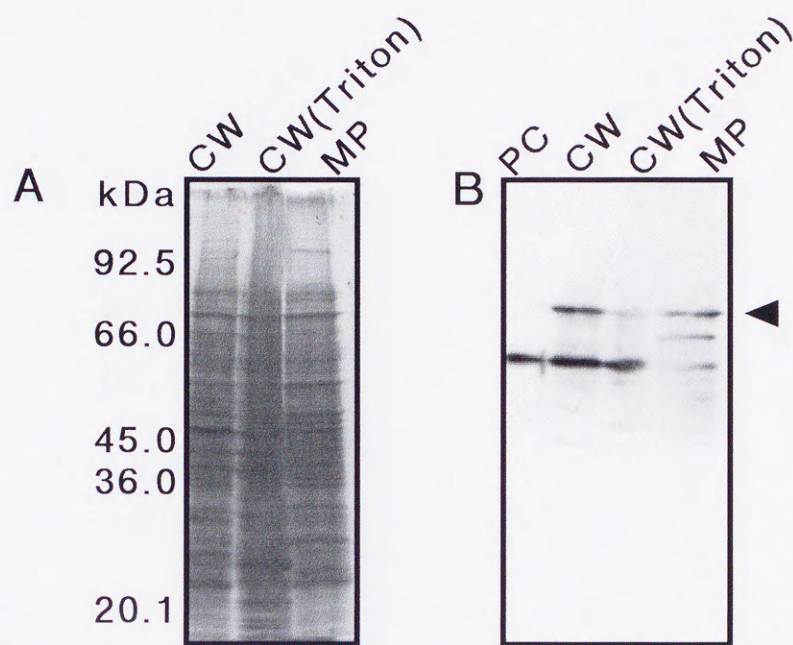


Fig. 50. Immunodetection of the RS224 homolog from cell wall fraction.
 (A) Coomassie blue-stained SDS-PAGE gel.
 (B) Western analysis of a gel identical to that (A). Proteins were electrophoresed in SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane for Western analysis. Lane CW, crude cell wall fraction ; lane CW (Triton), solubilized membranes from CW fraction by treating 2% Triton X-100 ; and lane MP, membrane proteins solubilized from CW. Molecular weight markers are indicated on the left. PC indicates positive control. The 90kDa-RS224 is indicated with arrow.

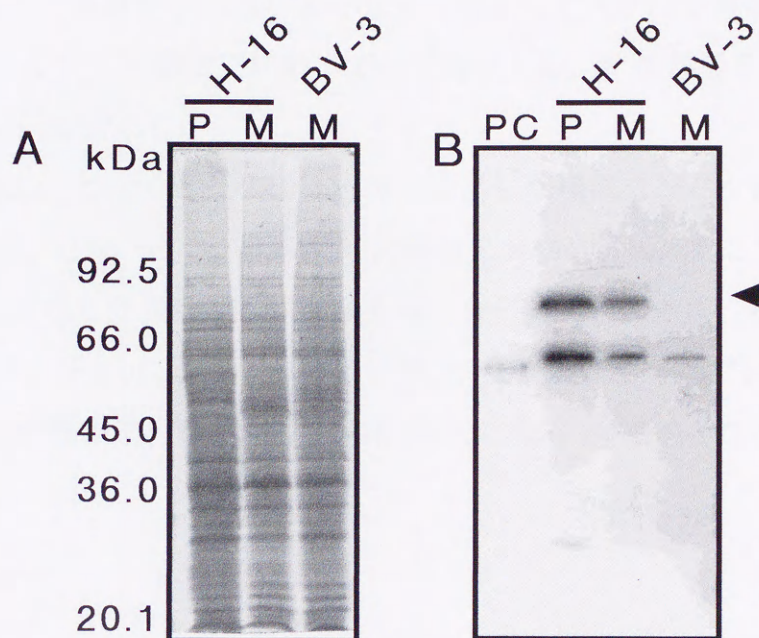


Fig. 51. Immunodetection of homologous protein to RS224 from mitochondrial fraction.

(A) Coomassie blue-stained SDS-PAGE gel.

(B) Western analysis of a gel identical to that (A). Proteins were electrophoresed in SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane for Western analysis. Lane P, fraction of cell wall and microorganela from H-16 isolate; lane M, mitochondrial fraction. Upper lanes indicate fungal isolate. Molecular weight markers are indicated on the left. PC indicates positive control. The homologous protein about 90kDa is indicated with arrow.

Totalタンパク質中、あるいは細胞分画によって得られた画分から抽出した場合では、どちらも相同タンパク質の量が少ないため、抗RS224-c抗体では検出できなかった。そこで90kDa付近にあるタンパク質を濃縮するために、15,000×gで20分遠心して得られた、相同タンパク質を多く含む沈殿からタンパク質を抽出して、10%アクリルアミド濃度でSDS-PAGE後、ゲルの90kDa付近のタンパク質が含まれる部分を切り出して、エレクトロエリューションによってタンパク質を回収し、再びこれを6%アクリルアミド濃度で泳動して、ブロットし、抗体処理を行って、相同タンパク質の検出を試みた。

ゲルからの抽出によって抗RS224-b抗体と反応した相同タンパク質の抗原性は失われていなかった (Fig. 52)。さらに、大量のタンパク質を泳動した場合、抗RS224-b抗体と反応した相同タンパク質と同じ分子量のバンドが、抗RS224-c抗体とも反応を示した (Fig. 52)。この場合のPCの濃度はRS224-bで1pg、RS224-cは10pgであり、抗体の濃度は抗RS224-c抗体をRS224-bの2倍となるようにして検出した。

考察

本章では*R. solani*のAG2が保持するプラスミドpRS224が宿主表現型に与える影響について検討するため、プラスミドを保持しているH-16菌株と保持していないBV-3菌株を供試して相同性のあるタンパク質の菌体内での発現と局在性について検討した。

大量培養後の生菌体重の経時変化はサンプリングを行った期間中（培養開始後2～6日）増加し続けた。培養1日目は増加は遅く、2～5日目で急激に増加し、6日目以降増加は緩慢になった。菌株間での菌体重増加量に顕著な差異は認められなかった。用いた菌株は*R. solani*の中では比較的菌体重の増加が遅いと思われた。

経時的にサンプリングを行った菌体から、Total RNAを抽出し、推定ORF領域の中央部をプローブとしてノザン解析を行い、転写領域のRNAの消長を経時的に検討した。H-16菌株ではサンプリングを行った全ての期間で7.4kbと4.7kbの相同RNA

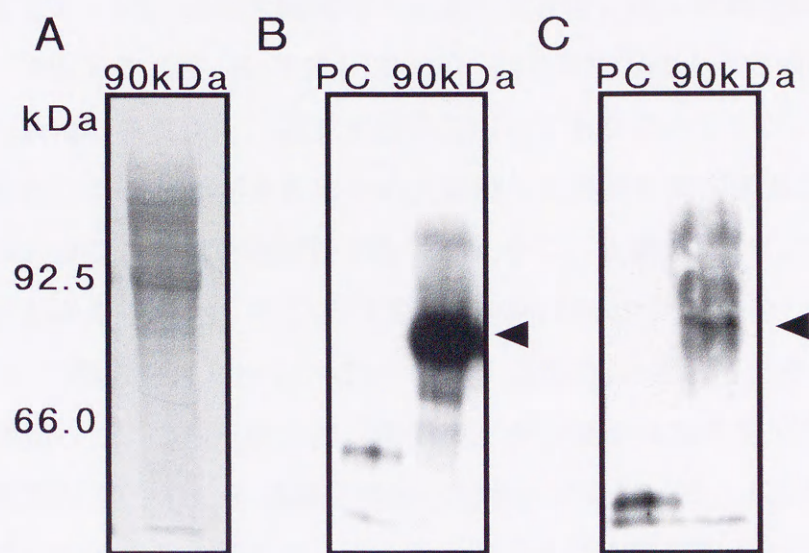


Fig. 52. Immunodetection of the homologous protein to RS224 treated with anti-RS224-c antibody.

(A) Coomassie blue-stained SDS-PAGE gel.

(B) and (C) Western analysis of a gel identical to that (A). Concentrated about 90kDa proteins by electroelution (lane 90kDa) were electrophoresed in 6% SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane for Western analysis. Blot was probed using antiserum raised against RS224-b (B) or RS224-c(C). Molecular weight markers are indicated on the left. PC indicates positive control. The homologous protein about 90kDa is indicated with arrow.

がほぼ一定量で検出された。BV-3菌株では全期間を通じてORF領域と相同性のあ
るRNAは見いだされなかった。このことから、培養開始後2～6日目にpRS224で見い
だされた推定ORF領域にコードされたタンパク質が菌体内で発現している可能性が
示唆された。

pRS224の推定ORFにコードされたタンパク質 (RS224) が菌体内で発現してい
るか検討するため、RS224を大腸菌内で大量発現させ、抗体作製を試みた。完全長
のORF領域 (888アミノ酸、分子量102kDa) をPCR反応によって増幅し、形質転換
を試みたが、数種のベクター、宿主大腸菌を用いてもクローニングは困難であっ
た。この原因としてはORFが大きいため大腸菌への形質転換が困難なこと、また、
RS224は既存のタンパク質と相同性がないことから、大腸菌に対して未知の毒性が
あることなどが考えられた。そこでORF領域を約800bpずつ3等分し、5'末端側から
順にRS224-a (36kDa) 、-b (38kDa) 、-c (33kDa) として、それぞれの断片を
PCR反応で増幅して、発現を試みた。発現ベクターpET-12aを用いた場合、いずれ
の断片も大腸菌BL21 (DE3) 菌株で発現は認められなかった。しかし発現ベクター
pGX-2Tを用いてGSTとの融合タンパク質の形で発現を試みたところ、RS224-b、-
cの断片からはタンパク質の顕著な発現が認められたが、RS224-a断片からはいずれ
の条件においても発現されなかった。。RS224-aの5'側をさらに約200bpディレー
ションしたクローン (ΔN /RS224-a) を作製して発現を試みたが、この場合も大量
発現は認められず、GSTの分子量の位置で増加するバンドが認められたのみであっ
た。抗GST抗体によって発現の確認を行ったところ、発現タンパク質と思われるバ
ンドの他に、それよりも小さい分子量のバンドが複数検出された。このことから、
RS224-aは途中でタンパク質の発現が停止しているか、あるいは分解している可
能性が考えられ、大量発現は困難と思われた。

大量発現させたRS224-b、RS224-cをそれぞれマウスに免疫して抗体作製を行っ
た。RS224-bタンパク質を免疫したマウスは3回の免疫で十分に抗体力価が上昇し
たが、RS224-cは6回の免疫を必要とし、且つ、最終的に得られた抗体力価は
RS224-bよりも低かった。RS224-cはアミノ酸配列などの何らかの事情により
RS224-bよりも抗原になりにくいと考えられた。

得られた抗体を用いて、相同RNAが検出された時期の菌体からTotalタンパク質を

抽出して、相同タンパク質の検出を行った。ニトロセルロース膜に1時間ブロットして、発色法による検出系を用いた場合、反応するバンドは検出されなかった。そこで、より検出感度をあげるために、PVDF膜を用いて、ブロット時間を3時間に延長して、ECL系による検出を行ったところ、大きさ約90kDaのバンドがH-16菌株からのみ検出された。また、大きさ約66kDaのバンドがH-16菌株では培養開始後2～6日目に、BV-3菌株では培養開始後2～3日目に検出された。大きさ90kDaのタンパク質は、プラスミドを保持しているH-16菌株から、相同RNAが検出されている期間に検出されたこと、さらに、RS224の予想分子量が102kDaであることから、本タンパク質がRS224と相同性を保持するタンパク質（相同タンパク質）と考えられた。66kDaのタンパク質はプラスミドを保持していないBV-3菌株からも検出されたことから、相同タンパク質ではないと判断した。さらに、60kDa以下の多数のバンドが両菌株で反応を示したが、弱いシグナルのためバックグラウンドと判断した。

培地中のタンパク質から相同タンパク質の検出を試みたところ、H-16菌株から培養開始後4～6日目に大きさ約30kDaのバンドが検出されたが、CBB染色を行ったところ、この位置に大きなバンドが存在していること、分子量が予想されたものより小さいことから、このタンパク質は相同タンパク質ではないと判断した。

90kDaの相同タンパク質の細胞内所在について検討を行うために、破碎バッファー中で破碎した菌体を14,000×gで15分間遠心し、相同タンパク質を含む画分が可溶性か不溶性かについて検討した。相同タンパク質は不溶性画分中に検出されたことから、細胞分画法を用いて小器官を粗分画し、検討を行った。生菌体を等張バッファー中で破碎し、未破碎の細胞・細胞壁・核を含む画分、ミトコンドリアを含む画分、その他膜構造画分、可溶性画分について検討したところ、ミトコンドリアより大きいサイズの器官を含む画分でバンドが検出された。相同タンパク質の所在が膜成分中なのか、壁成分に由来するものなのか検討を行うために、1,000×gで遠心して得られた画分を2% Triton X-100で1時間処理し、膜成分を可溶加した画分について検討を行った。相同タンパク質のバンドは沈殿画分から消失し、上清画分から検出された。このことから、相同タンパク質は膜成分由来であると判断した。また1,000×gで遠心して得られた画分を低張の洗浄バッファーに懸濁し、1,000×gで遠心する操作を数回繰り返したところ、相同タンパク質のバンドが消失したことか

ら、相同タンパク質は細胞膜ではなく細胞内小器官に存在していると考えられた。AG4のpRS64がミトコンドリア内在性であることから、pRS224もミトコンドリア内在性である可能性が予想されたため、H-16、BV-3の両菌株から細胞分画によってミトコンドリア粗画分を得た後、ショ糖密度勾配を用いて精製ミトコンドリア画分を得て検討した。相同タンパク質はH-16菌株からのみ検出されたことから、相同タンパク質はミトコンドリアに存在している可能性が考えられた。

本研究ではRS224の中央領域を認識する抗RS224-b抗体と、C末端側を認識する抗RS224-c抗体を作製した。しかし抗RS224-c抗体は抗RS224-b抗体と力価を比較した場合、50倍ほど検出限界が低かった。Totalタンパク質中や膜溶出画分に含まれる相同タンパク質と抗RS224-c抗体は反応しなかったが、これらに含まれる濃度では、抗RS224-c抗体によって検出限界以下である可能性が考えられた。そこで、SDS-PAGE後に90kDa付近のゲルを切りだして、エレクトロエリ्यूションによってタンパク質を回収し、相同タンパク質を濃縮して、抗RS224-c抗体との反応を検討した。抗RS224-b抗体を用いて濃縮したタンパク質中から相同タンパク質の検出を試みたところ、強いシグナルが検出され、濃縮されていることが示された。また抗RS224-c抗体を用いた場合にも抗RS224-b抗体によって検出された相同タンパク質と同じ分子量のバンドが検出された。相同タンパク質のシグナルの強さは抗RS224-b抗体を用いた場合よりも弱く、Fig. 43、44で示された抗体力価と一致する結果となった。このことから2種類の抗体と反応した大きさ90kDaの相同タンパク質は、RS224である可能性が高いと考えられた。

AG2-2では保持するプラスミド、pRS224からタンパク質が発現している可能性が示唆された。今後はこのタンパク質の機能について明らかにすることによって、*R. solani*の保持するプラスミドの機能を明らかにする手がかりとなることが期待される。

V 総合考察

植物病原糸状菌が宿主に対して病原性を示す際に、宿主のさまざまな防衛機構を突破し、感染部位から養分を吸収しつつ自身が効率的に増殖していくためには、さまざまなファクターが必要であると考えられる。植物病原糸状菌が宿主特異的あるいは非特異的毒素、セルラーゼやプロテアーゼなど種々の分解酵素などの宿主植物の防衛機構を積極的に突破するための生化学的ツールを産生することや、あるいは付着器などの形成により物理的に植物の防衛機構を突破しようとする器官を形成することは、病原性を示すためという視点からは理解しやすい。一方、植物病原糸状菌はavr gene産物などのように自身のためにどのような生物活性があるのか分からず、宿主に積極的な防御反応である過敏感反応を引き起こすようなものも産生する。また植物病原糸状菌からは機能が明確ではないにも関わらず、gene disruptionなどによってその遺伝子を失うことにより、明らかに病原性が低下するような遺伝子も幾つか見いだされている。これら機能不明のタンパク質を解析することは、植物と病原体との相互作用を解明する上での新たな視点になると期待される。

植物病原糸状菌の中には核外遺伝子として、プラスミドを保持しているものが幾つか報告されている。これらが宿主である糸状菌の形質に与える影響については現在明確になっていない。しかし*F. oxysporum*のように菌の分化型と保持しているプラスミドの種類が一致している場合や (Kistler et al. 1986, 1987, Hirota et al. 1992)、*R. solani*のように各菌糸融合群ごとに特有の配列と大きさのプラスミドを保持し (Miyasaka et al. 1990)、かつ各群のプラスミドからRNAが転写されているような場合 (Kuradate et al. 1996)、プラスミドが宿主糸状菌の表現型に何らかの影響を与えている可能性が考えられる。*R. solani*のプラスミドが、病原性に関与しているかについては明確な回答は得られていない。またこれまでに見いだされているプラスミドは線状、環状に関わらずアミノ酸配列の相同性から、自身の複製のための酵素をコードしていると考えられている。しかし、*R. solani*のプラスミドがコードしたタンパク質は、既知のタンパク質と相同性を示さない点からも、どのような機能を果たしているのか興味を持たれる。

AG4の保持するプラスミド、pRS64は大きさ約7kDaの新規タンパク質、RS64を

コードしている。本領域を含む大きさ0.5kbの相同RNAがプラスミドを保持している菌株から検出されたことから、プラスミドからRS64が発現している可能性が考えられた。しかしプラスミドを含まない1271菌株からも約1.2kbの相同RNAが検出され、抗RS64抗体を用いて菌体からタンパク質を検出したところ、AG4に属する菌株からプラスミドの有無に関わらず、大きさ約12kDaの相同タンパク質が検出された。またpRS64のORFを含む配列をプローブとして1271のゲノミックサザンを行うと、ハイブリダイズするバンドが存在した。従ってAG4の場合はプラスミドから転写されたRNAがタンパク質に翻訳されているかは不明であるが、ゲノム上にすでにpRS64とある程度相同な配列が存在し、ここから何らかのタンパク質が発現している可能性が考えられた。このタンパク質を2D-PAGEで展開したところ、pI11を示し、RS64の予想等電点10.9と近い値となったことから、検出された相同タンパク質はRS64と近い生化学的性質を持っている可能性が考えられた。ペプチドマッピング後、内部のアミノ酸配列を解析したところ、RS64と同じ配列は見いだされなかった。しかし、タンパク質の相同性を考察する上で、完全に配列が一致していなくても、保存モチーフのような形でRS64と同じ配列が相同タンパク質中に存在していれば、類似の機能を保持している可能性がありうると考えられる。検出された相同タンパク質のアミノ酸シーケンスでは相同部位は見いだせなかったが、抗RS64抗体と反応を示したことからも部分的にRS64と相同性を有している可能性が考えられる。RI-64菌株は1271菌株が衰退現象を引き起こした土壌から再分離された菌株であるが、この両者から相同タンパク質が検出されたことから病原性の低下と相同タンパク質の間に相関関係は薄いと思われる。また、検討を行ったAG4に属する4つの菌株から相同タンパク質が検出されたことから、今後はAG4における共通ファクターとして存在するゲノム上のpRS64との相同配列について解析を行う必要があると思われる。アミノ酸シーケンスによって得られた相同タンパク質の部分配列2箇所についてFASTAによってホモロジー検索を行ったところ、profilinと高い相同性を示した。分子量並びにタンパク質の所在が細胞壁である可能性が示唆されたことから、相同タンパク質はprofilinである可能性が高い。しかし、profilinのpIは5~7.5であるのに対し、相同タンパク質の等電点はpI11であったこと、profilin全体の配列と、RS64の配列の間にホモロジーはまったく見いだせなかったこと、また

BLASTsearchではホモロジーのあるタンパク質が見いだされなかったことから、今後は得られたアミノ酸配列を元にプライマーを構築して、完全長のタンパク質の配列を得て、検出された相同タンパク質が実際にprofilinであるか、さらに内部配列中のRS64との相同性についてさらに解析を行う必要がある。また、profilinでない場合、相同タンパク質の所在が細胞壁であったこと、AG4の菌株から共通に検出されたことから*R. solani*の宿主、あるいは菌糸融合群の認識を考慮する上で興味深い。avr gene産物などのように細胞外に分泌され、認識に関与しているタンパク質も既知のタンパク質とは相同性を示さないことが多い (Van Kan et al. 1991, Rohe et al. 1995)。相同タンパク質は培地上には分泌されていなかったが、もし宿主植物上で、あるいは菌糸融合の際に分泌されたとしたら、AG4に共通に存在している相同タンパク質はこれらの認識に関与している可能性が考えられる。AG4の保持するプラスミドはミトコンドリア内在性であることから、もしRS64が発現しているとしたら、抗体と反応する相同タンパク質はミトコンドリア画分に存在している可能性があると考え、1271菌株とRI-64菌株を供試してショ糖密度勾配で精製したミトコンドリア画分を得、相同タンパク質の検出を試みた。どちらの菌株を供試した場合も、大きさ約14kDaのタンパク質が検出されたことから、この画分に存在する抗体と反応したタンパク質はプラスミドから発現したものではないと判断した。しかし、抗RS64抗体と反応したことから、このタンパク質も内部に何らかの相同配列が存在している可能性が考えられる。ミトコンドリアゲノム中にはpRS64と相同な配列は存在していないことから、本画分から検出された相同タンパク質に関しても核ゲノム由来であると考えられる。今後、このタンパク質に関しても内部アミノ酸配列の解析を試み、RS64との相同性について検討する必要がある。

一方、AG2-2の保持するプラスミド、pRS224も、大きさ約102kDaの機能不明の新規タンパク質、RS224をコードしている。相同タンパク質はプラスミドを保持したH-16菌株から、相同RNAが転写されている期間に検出されたが、プラスミドを保持していないBV-6菌株からは検出されなかった。従ってH-16菌株で見いだされた相同タンパク質はプラスミドからの転写RNAの翻訳産物である可能性が高いと考えられる。糸状菌で検出されたプラスミドのほとんどはミトコンドリア内在性であり、且つ*R. solani*においてもAG4の保持するプラスミドはミトコンドリア内在性で

ある可能性が示唆されていることから、細胞分画法を用いて相同タンパク質の細胞内所在について検討した。相同タンパク質はミトコンドリアよりも大きな細胞内小器官を含むフラクションに存在し、膜成分を可溶化することによって上清画分に移行し、 $1,000\times g$ で5分間という低速・短時間の遠心で得られた画分を、低張バッファに懸濁して低速で遠心する操作を繰り返すことによって失われてしまうことから、タンパク質は細胞内小器官に存在している可能性が示唆された。ショ糖密度勾配によって精製ミトコンドリア画分を得て、同様の検討を行ったところ、相同タンパク質は本画分に存在していたことから、ミトコンドリアに存在していると考えられた。現在までに報告されているミトコンドリア内在性の線状プラスミドはほとんどが5'末端にTPが結合した構造をとっており、TPをプライマーとして自らがコードした複製酵素によって複製していく、アデノウイルス様の複製様式をとると考えられている (Challberg et al. 1982)。しかし末端がヘアピンループによってつながったプラスミドは *R. solani* 以外にこれまで報告はなく、このような構造をとるワクシニアウイルスのような末端セルフプライミング型の複製形式をとると予想されている (Miyashita et al. 1990)。しかし、pRS224はワクシニアウイルスのように末端がFilip-Frop構造をとっていないことから、これまでにこれらのウイルスで知られた複製酵素様のタンパク質とは異なる構造の複製酵素が複製に関与している可能性が考えられる。RS224は既知のタンパク質との相同性がみられないものの、一部配列が肝炎ウイルスの一種であるウイルスのDNAポリメラーゼとわずかに相同性を示すことからRS224は複製に関与している可能性が考えられる。

RS64とRS224タンパク質は等電点は類似しているものの、分子量に約14倍の差があること、配列上の相同性が全くみられないことから、もしこれらに何らかの機能があったとしても、同じ機能であるとは考えにくい。実際に菌体から検出された相同タンパク質の所在が異なっていたことから、これらタンパク質は機能が異なっている可能性が示唆される。もし、*R. solani*の各AGが保持するプラスミドにはそれぞれ異なるタンパク質がコードされており、これらがそれぞれ異なる機能を保持しているならば、*R. solani*はどのプラスミドを保持するかによってその表現型が異なってくる可能性が考えられる。あるいはこれらプラスミドが各AGにおいてその表現型に全く影響を与えていないとすれば、プラスミドは何らかの形で宿主と共存し

つつ、自律増殖できるような仕組みを持っていると考えられる。またプラスミドは通常の条件では安定して存在し続け、経代培養を続けても失われることがないことから、プラスミドを保持した菌株からプラスミドを失わせるような方法、あるいはAG4で見られたようなもともとプラスミドを保持していなかった菌株が保持するようになる仕組み、プラスミド上の自律増殖に必要な配列についてさらに解析を行えば、外来遺伝子の導入が困難な*R. solani*において、全く新たな糸状菌ベクターとして利用できる可能性が考えられる。

本研究において*R. solani*が保持するプラスミドにコードされているタンパク質と相同性のあるタンパク質が菌体で発現していることが示されたが、AG4では相同タンパク質はゲノム上の相同配列から、AG2-2ではプラスミドから発現している可能性が示唆され、それぞれのAGでその所在が異なる可能性が示唆された。今後はこれら相同タンパク質の解析を進め、プラスミドとの関係を明らかにすると共に、プラスミドの保持によって*R. solani*の表現型が変化するかについて解析を行うことによって、本菌がAGによって特有の大きさと配列のプラスミドを保持する原因について解明されることが期待される。

VI 摘要

*R. solani*のAG4とAG2-2はそれぞれ末端がヘアピンループ構造でつながった線状プラスミド、pRS64とpRS224を保持している。これらはそれぞれ機能不明のタンパク質、RS64とRS224をコードしている。本研究ではこれらと相同性があると思われるタンパク質の菌体内での発現と所在について検討した。

1. AG4におけるRS64の検出感度をさらに向上させるため、モノクローナル抗体の作製を試みた。合成ペプチドを用いて免疫を行ったところ、十分な力価は得られなかった。GSTとの融合タンパク質を用いて免疫を試みたところ、力価の高い抗体が得られたため、ハイブリドーマを作製し、モノクローナル抗体を作成した。得られたモノクローナル抗体は、合成ペプチドのN末端側にエピトープが存在した。
2. AG4群の4菌株（1271、R101、GM-11、RI-64）を供試して全タンパク質を抽出し、相同タンパク質の検出を試みた。プラスミドの有無に関わらず、供試した全ての菌株から12kDa付近に抗RS64抗体と反応するタンパク質が存在した。
3. プラスミドを保持していない1271菌株のゲノム上にpRS64と相同な配列がないかpRS64のクローンをプローブとしてサザン解析を行ったところ、複数のハイブリダイズするバンドが存在した。
4. 抗RS64抗体で相同タンパク質が検出された4菌株を供試して、相同RNAの転写について検討した。プラスミドを保持した菌株からは0.5kbの相同RNAが検出された。さらに大きさ1.2kbの相同RNAがプラスミドの有無に関わらず、供試した全ての菌株から検出された。
5. 抗RS64抗体と反応した相同タンパク質の細胞内所在について検討したところ、細胞壁画分に存在した。

6. 抗RS64抗体と反応した相同タンパク質は細胞壁画分から酸-アルカリ処理によって選択的に可溶化が可能であった。
7. 酸-アルカリ処理によって選択的可溶化を行った抗RS64抗体と反応した相同タンパク質の、糖鎖修飾を受けているかどうかについてシッフ反応により検討したが、糖鎖の付加は受けていないと思われた。
8. 酸-アルカリ処理によって可溶化した抗RS64抗体と反応した相同タンパク質を、2D-PAGEによって単一スポットとして単離した。相同タンパク質の等電点はpI11付近であり、RS64の等電点に近い値であった。
9. 2D-PAGEによって単離した抗RS64と反応した相同タンパク質のN末端アミノ酸配列の解析を試みたところ、何らかの修飾を受けていると思われた。プロテナーゼKによって内部からのN末端シーケンスを試みた。N末端シーケンスで得られた部分配列とRS64との間に相同性は見いだされなかった。FASTAにより既知のタンパク質との相同性を検討したところ、相同タンパク質はprofilinと高い相同性を示した。またC末端側からのアミノ酸配列を解析したところ、C末端から4番目までのアミノ酸配列が明らかとなった。
10. pRS64がミトコンドリア内在性であることから、AG4の1271とRI-64からショ糖密度勾配によってミトコンドリア画分を得、相同タンパク質の検出を試みたところ、大きさ約15kDaの相同タンパク質が両菌株から検出された。
10. AG2-2に属するプラスミドを保持したH-16菌株と、保持していないBV-3菌株を供試して、相同RNAの検出を行ったところ、H-16菌株から、7.4kbと4.7kbの相同RNAが検出された。
11. RS224の大腸菌での大量発現を試みたところ、完全長の発現は困難だった。

ORFを約800bpづつ3等分し、N末端からRS224-a、-b、-cとして発現を試みたところ、RS224-bと-cは大腸菌内で発現した。

12. 得られた発現タンパク質を用いてマウスによるポリクローナル抗体の作成を試みた。発色系により力価を検討したところ、抗RS224-b抗体は坑原0.5pg、抗RS224-c抗体は坑原1ngまで検出が可能だった。

13. 得られた抗RS224-b抗体を用いて、H-16、BV-3の2菌株から抽出した全タンパク質から相同タンパク質の検出を行った。大きさ約90kDaの相同タンパク質がH-16菌株からのみ検出された。

14. 相同タンパク質の所在について細胞分画法を用いて検討したところ、ショ糖密度勾配による精製ミトコンドリア画分から相同タンパク質が検出された。

15. エレクトロエリューションによって90kDa付近のタンパク質を濃縮し、抗RS224-c抗体で検出を行ったところ、抗RS224-b抗体と反応した相同タンパク質は抗RS224-c抗体とも反応した。

本研究では*R. solani*のAG4、AG2-2の保持するプラスミドのORFにコードされたタンパク質について検討した。AG4はプラスミドからではなくゲノム上にプラスミドと相同な配列が存在しており、抗RS64抗体と反応する相同タンパク質が発現している可能性が示唆された。AG2-2はプラスミド上のORFからタンパク質が発現している可能性が示唆された。*R. solani*は各菌糸融合群ごとに特有の大きさと配列のプラスミドを保持していることから、他の菌糸融合群の保持するプラスミドに関してもそこにコードされたORFからタンパク質の発現の有無と、ゲノム上の相同配列について検討することによって、プラスミドの機能が明らかになると考えられる。

Adach K., and Hammer J. H. (1998)
Divergent cAMP signaling pathways regulate growth and pathogenesis in the
rice blast fungus *Magnaporthe grisea*
The Plant Cell 10: 1361-1373

Bertrand H., Chan. BS-S., and Griffiths A. J.F. (1985)
Insertion of a foreign nucleotide sequence into mitochondrial DNA causes
senescence in *Neurospora intermededia*
Cell 41: 877-884

Bertrand H., Griffiths A. J.F. Court D. A., and Cheng C., K. (1986)
An extra mitochondrial plasmid that is homologous to kalDNA insertion
sequences in the mitochondrial chlomosome of senescent cells of *Neurospora*
intermededia Cell 47: 829-834

Cao,H., Glazerbrook J., Clarke J. D., Volko S., and Dong X. (1997)
The Arabidopsis *NPR1* gene that controlssystemic acquired resistance
encodes a novel protein containing ankyrin repeats
Cell 88: 57-63

Cappellaro C., Baldermann C., Rachel R. and Tanner W. (1994)
Mating type-specific cell-cell recognition of *Saccharomyces cerevisiae*: cell
wall attachment and active site of a- and α -agglutinin
The EMBO Journal 13: 4737-4744

Castanho B., Butler E. E., and Shepherd R. J. (1978)
The association of double-stranded RNA with Rhizoctonia decline
Phytopathology 68: 1515-1519

Challberg, M. D. and Kelly Jr. T. J. (1982)
Eucaryotic DNA replication: viral and plasmid model system
Ann. Rev. Biochem. 51: 901-934

Chan B. S. S., Court D. A., Vierula J. P., and Bertrand H. (1991)
The Kalilo sequence-inducing plasmid of *Neurospore* is an invertron and
encodes DMA and RNA polymerase
Curr. Genet. 20: 225-237

Chen B., Gao S., Choi H., and Nuss D. L. (1996)
Extensive alteration of fuungal gene transcript accumulation and elevation of

G-protein-regulated cAMP levels by a virulence-attenuating hypovirus
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7996-8000

Chen C. H., Miyasaka A., Miyashita S., Ehara Y., and Hashiba T. (1989)
Genetic relatedness of plasmid-like DNA in isolate from anastomosis group 4
Rhizoctonia solani Ann. Phytopath. Soc Jpn. 58: 286-291

Choi W., and Dean R. A. (1997)
The adenylate cyclase gene *MAC1* of *Magnaporthe grisea* controls
appressorium formation and other aspects of growth and development
The Plant Cell 9: 1973-1983

Chomczynski P., and Sacchi N. (1982)
Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate phenol-
chloroform extraction
Analy. Biochem. 162: 156-159

Churchill A. C. L., Ciuffetti L. M., Hansen D. R., Van Etten H. D.,
and Van Alfen N. K. (1990)
Transformation of the fungal pathogen *Criponectria parasitica* with a variety
of heterologous plasmids
Curr. Genet. 17: 25-32

Court D. A., Griffiths A. J. F. Kraus S. R. Russell P. J., and Bertrand H.
(1991) A new senescence-inducing mitochondrial linear plasmid in
field-isolated *Neurospora crassa* strains from India
Curr. Genet. 19: 129-137

Cullen D., Budde A., Kisttler H., Samac D., and Leong S. (1985)
Characterization of a linear DNA plasmid from the filamentous fungal plant
pathogen *Fusarium sporotrichoides*
Curr. Genet 32: 152-156

Devine P. L., and Warren J. A. (1990)
Glycoprotein detection on Immobilon PVDF transfer membrane using the
periodic acid/schiff reagent
Bio-Techniques 8: 492-425

Duvell A., Hessberg-Stutzke H., Osser B., Rogmann-Backwinkel P., and
Tudzynski P. (1988)
Structural and functional analysis of mitochondrial plasmids in *Claviceps*

purpurea

Mol. Gen. Gemnet. 214: 128-134

Finkler A., Koltin Y., Barash L., Sneh B., and Pozynac B. (1985)
Isolation of a virus from virulent strains of *Rhizoctonia solani* J. Gen. Viol. 66:
1221-1232

Flor H. H. (1971)
Current status of the gene-for-gene concept
Annu. Rev. Phytopathol. 9: 275-296

Flor H. H. (1956)
The complementary genetic systems in flax and flax rust
Adv. Genet. 8: 29-54

Fox T. D. (1987)
Natural variation in the genetic code
Annu. Rev. Genet. 21: 67-91

Freeman S., Redman R. S., Grantham G., and Rodriguez R. I. (1997)
Characterization of a linear DNA plasmid from the filamentous fungal plant
pathogen *Fusarium sporotrichoides*
Curr. Genet. 32: 152-156

Garber R. C., Turgeon B. G., and Yoder O. C. (1984)
A mitochondrial plasmid from the plant pathogenic fungus *Cochliobolus*
heterostrophus
Mol. Genet. Genet. 196: 301-310

Gessner-Ulrich K., Tudzynski P. (1994)
Studies on function and mobility of mitochondrial plasmids from *Claviceps*
purpurea
Mycol. Res. 98: 511-515

Gessner-Ulrich K., Tudzynski P. (1992)
Transcripts and translation products of a mitochondrial plasmid of *Claviceps*
purpurea
Curr. Genet. 21: 249-254

Giasson I., and Lalonde M. (1987)

Analysis of a linear plasmid isolated from the pathogenic fungus *Ceratocystis fimbriaria* and host
Curr. Genet. 11: 331-334

Hanahan (1983)
Techniques for transformation of *E. coli*
In DNA Cloning vol. 1 (D. M. Glover Ed.) IRL press, Oxford, pp109-135

Hashiba T., Homma T., Hyakumachi M., and Matsuda I. (1984)
Isolation of a DNA plasmids in the fungus *Rhizoctonia solani*
J. Gen. Microbiol. 130: 2067-2070

Hirano H. (1989)
Microsequence analysis of the winged bean seed proteins electroblotted from two-dimensional gel
J. Protein Chem. 8: 115-130

Hirano H. and Watanabe T. (1990)
Microsequencing of proteins electrotransferred onto immobilizing matrices from polyacrylamide gel electrophoresis: Application to an insoluble protein
Electrophoresis 11: 573-580

Hirota N., Hashiba T., Kikumoto T., and Ehara Y. (1992)
Detection and properties of plasmid-like DNA in isolates from twenty three formae speciales of *Fusarium oxysporum*
Ann. Phytopath. Soc. Jpn. 58: 386-392

Hirt B. (1967)
Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell culture
J. Mol. Biol. 26: 365-369

Hyakumachi M., Homma Y., and Ui T. (1984)
Properties of diseased isolates of *Rhizoctonia solani* AG4
Ann. Phytopathol. Jpn. 50: 281-285

Jian J. H., Lakshman D. K., and Tavantzis S. M. (1998)
A virulence associated, 6.4-kb, double-stranded RNA from *Rhizoctonia solani* is phylogenetically related to plant bromo-viruses and electron transport enzymes
Mol. Plant-Microbe Interact. 11: 601-609

Jian J. H., Lakshman D. K., and Tavantzis S. M. (1997)
Association of Distinct Double-Stranded RNAs with Enhanced or Diminished
Virulence in *Rhizoctonia solani*
Mol. Plant-Microbe Interact. 10: 1002-1009

Jones D. A., Thomas C. M., Hammond-Kosack K. E., Balint-Kurti P. J.,
and Jones J. D. G. (1994)
Isolation of the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by
transposon tagging
Science 266: 789-793

Juderson H. J., Tyler B. M., and Michelome R. W. (1991)
Transformation of the oomycete pathogen, *Phytophthora infestans* Mol.
Plant-Microbe Interact. 6: 15-25

Kaneko I Katsuya S., and Tsuge T. (1997)
Structural analysis of the plasmid pAAT56 of the filamentous fungus
Alternaria alternata
Gene 203: 51-57

Kang S., Chumley F. G., and Valent B. (1994)
Isolation of the mating-type genes of the phytopathogenic fungus
Magnaporthe grisea using genomic subtraction
Genetics 138: 289-296

Katsura K., Suzuki F., Miyashita S., Nishi T., Hirochika H., and Hashiba T.
(1997)
The complete nucleotide sequence and characterization of the linear DNA
plasmid pRS64-2 from the plant pathogenic fungus
Curr. Genet. 32: 431-435

Kim W. K., McNabb S. A., and Klassen G. R. (1988)
A linear plasmid in *Tilletia controversa* a fungal pathogen of wheat Canad. J.
Botany 66: 1098-1100

Kistler C., Bosland P. W., Benny U., Leong S. A., and Williams P. H. (1987)
Relatedness of strains of *Fusarium oxysporum* from crutifers measured by
examination of mitochondrial and ribosomal DNA
Phytopathology 77: 1289-1293

- Kistler H. C., and Leong S. A. (1986)
Linear plasmidlike DNA in the plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*
f. sp. *conglutinans*
J. Bacteriol. 167: 587-593
- Kousik C. K., Snow J. P., and Valverde R. A. (1994)
Comparison of double-stranded RNA components and virulence among
isolates of *Rhizoctonia solani*
Phytopathology 84: 633-639
- Kudo T., Morishita R., Suzuki (Seno) R., and Tachibana T. (1987)
A great improvement of fusion efficiency in mouse B cell hybridoma
production by use of the new culture medium, GIT
Tohoku J. Exp. Med. 153: 67-74
- Kuninaga S., Natsuki T., Takeuchi T., and Yokosawa R. (1997)
Sequence variation of the rDNA ITS region within and between anastomosis
groups in *Rhizoctonia solani*
Curr. Genet. 32: 237-243
- Kuradate K., Namai K., Miyasaka A., Katsura K., Ito K., and Hashiba T.
(1996) Detection of transcripts homologous to DNA plasmids in isolates
from six anastomosis groups of *Rhizoctonia solani*
Ann. Phytopathol. Soc. Japan 62: 147-152
- Laemmli U. K. (1970)
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of
bacteriophage T4
Nature 227: 680-685
- Lakshman D. K., Jian J., and Tavantzis S.M. (1998)
A double-stranded RNA element from a hypovirulent strain of *Rhizoctonia*
solani occurs in DNA form and is genetically related to pentafunctional AROM
protein of the shikimate pathway
Proc. Natl. Acad. Sci. USA
- Leugh H., Lehtinen U., Karjalainen R., Skinner D., Tooley P., Leong S., and
Ellingboe A. (1990)
Transformation of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* to hygromycin B
resistance

Curr. Genet. 17: 409-411

Liu S., and Dean R. A. (1997)

G protein α subunit genes control growth, development, and pathogenicity of *Magnaporthe grisea*

Mol. Plant-Microbe Interact. 10: 1075-1086

MacMaster G.K., and Carmichael G. G. (1997)

Analysis of single- and double stranded nucleic acids polyacrilamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange

Proc Natl. Acad. Sci. USA 11: 4835-4838

Miyasaka A., Chen C. L., and Hashiba T. (1990)

Detection and properties of plasmid-like DNA in isolates from nine anastomosis and intraspecific group of *Rhizoctonia solani*

J. Gen. Microbiol 136: 1791-1798

Miyashita S., Hirochika H., Ikeda J., and Hashiba T. (1990)

Linear plasmid DNAs of the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani* with unique terminal structures

Mol. Gen. Genet. 220: 165-171

Martin G. B., Brommonschenkel S. H., Chunwongse J., Frary A., Ganal M., W., Spivey R., Wu t., Earle E. D., and Tanksley S. D. (1993)

Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato

Science 262: 1432-1436

Normands P., Simonet P., Giasson L., Ravel C. P., Fortin J. A., and Lalonde M. (1987)

Presence of a linear plasmid-like DNA molecule in the fungal pathogen *Ceratocystis fimbriaria*

Curr. Genet. 11: 335-338

Nuss D. l. (1996)

Using hypoviruses to probe and perturb signal transduction processes underlying fungal pathogenesis

The Plant Cell 8: 1845-1853

O'Farrell P.H. (1975)

High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins

J. Biol. Chem. 250: 4007-4021

Oeser B., and Tudzynski (1989)

The linear mitochondrial plasmid pCLK1 of the phytopathogenic fungus *Claviceps purpurea* may code for a DNA polymerase and an RNA polymerase
Mol. Gen. Genet 217: 132-140

Oliver R.P., Roberts I. N., Harling R., Kenyon L., Punt P. J. Dingemanse M. A., and Van Den Hondel C. A. M. J. J. (1987)

Transformation of *Fulvia fulva*, a fungal pathogen of tomato, to hygromycin B resistance
Curr. Genet. 12:231-233

Osbourn A., Bowyer P., Lunness P., Clarke B., and Daniels M. (1995)

Fungal pathogens of oat roots and tomato leaves employ closely related enzymes to detoxify different host plant saponins
Mol. Plant-Microbe Interact. 8: 971-978

Osiewacz H. D., and Esser K (1984)

The mitochondrial plasmid of : a mobile intron of a mitochondrial gene
Curr. Genet. 8: 299-305

Plough M., Jensen A. L., and Barkholt V. (1989)

Determination of amino acid compositions and NH₂-terminal sequences of peptides electroblotted onto PVDF membranes from tricine SDS-PAGE: Application to peptide mapping of human complement component C3
Anal. Biochem. 181: 33-39

Pringle J. R., Adams A. E. M., Drubin D. G., and Haarer B. K. (1991)

Immunofluorescence Method for yeast: Affinity purification on Nitrocellulose Blots
Methods in Enzymology 194 (Guthrie C., and Fink G. R. Ed) Academic press : 581-584

Rohe M., Gierlich A., Hermann H., Hahn M., Schmidt B., Rosahl S., and Knogge W. (1995)

The race-specific elicitor, *NIP1*, from the barley pathogen, *Rhynchosporium secalis*, determines avirulence on host plants of the *Rrs1* resistance genotype
EMBO J. 14: 4168-4177

- Rohe M., Searle J., Newton A. C., and Knaogge W. (1996)
Transformation of the plant pathogenic fungus, *Rhynchosporium secalis*
Curr. Genet. 29: 587-590
- Ryals J. A., Weymann K., Lawton K., Freiedrich, L Ellis, D., Steiner H.-J.,
Jhonson J, Delaney T. P., Jesse T., Vos, p. and Ukness S. (1997)
The arabidopsis *NIM1* protein shows homology to the mammalian
transcription factor inhibitor I κ B
The Plant Cell: 9 425-439
- Schagger H. J., and Von Jagow G. (1987)
Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the
separation of protein in the range from 1 to 100kDa
Anal. Biochem. 166: 368-379
- Scofield S. R., Tobias C. M., Rathjen J. P., Chang J. H., Lavelle D. T.,
Micheimore R. W., and Staskawicz B. J. (1996)
Molecular basis of rene-for-gene specificity in bacterial speck disease of
tomato
Science 274: 2063-2065
- Scott-Craig, J., S., Panaccione D., G. Pocard J. A. (1992)
The cyclic peptide synthetase catalyzing HC-toxin production in the
filamentous fungus *Helminthosporium carbonum* is encoded by a 15.7kb
open reading frame
J. Biol. Chem. 67: 26044-26049
- Shimma Y.-I., Uno I., Hashiba T., and Ishikawa T. (1988)
Characterization of a *Rhizoctonia solani* strain carrying plasmids
J. Genel. Appl. Microbiol. 34: 111-117
- Smac D. A. and Leong S. A. (1988)
Two linear plasmids in mitochondria of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae*
Plasmids 19: 57-67
- Stam J. C., Kwackman j., Meijer M., and Stuitte A. R. (1986)
Efficient isolation of the linear DNA Killer DNA Plasmis of *Kluyveromyces*
lactis: evidence for location and expression in the cytoplasm and
characterization of their terminally found proteins
Nucleic Acids RES. 12: 6011-6030

Talbot N. J., Kershaw M. J., Wakley G. E., de Vries O. M. H., Wessels J. G. H., and Hammer J. E. (1996)

MPG1 encodes a fungal hydrophobin involved in surface interaction during infection-related development of *Magnaporthe grisea*
The Plant Cell 8: 985-999

Tang X., Frederick R. D., Zhou J., Halterman D. A., JIAY., and Martin G. B. (1996)

Initiation of plant disease resistance by physical interaction of *AvrPto* and *Pto* kinase
Science 274: 2060-2063

Tudzynski P., and Duvell A. (1983)

Extrachromosomal genetics of *Claviceps purpurea* I. Mitochondrial DNA and mitochondrial plasmids
Curr. Genet 7: 145-150

Van Kan J. A. L., Van den Ackerveken G. F. J. M., and De Wit P. J. G. M. (1991)

Cloning and characterisation of cDNA of avirulence gene *avr9* of the fungal pathogen *Cladosporium fulvum*, causal agent of tomato leaf mold
Mol. Plant-Microbe Interact. 4: 52-59

Wahleithner J. A., Xu F., Brown K. M., Brown S. H., Golightly E. J., Halkier T., Kauppinen S., Pederson A., Schneider P. (1996)

The identification and characterization of four laccases from the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*
Curr. Genet. 29: 395-403

Wako T., Ishikawa T., and Hashiba T. (1991)

Unique DNA plasmid pRS64 associated with chromosomal DNAs of the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*
J. Gen. Microbiol. 137: 2817-2821

Wang J., Holden D. and Leong S. (1988)

Gene transfer system for the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*
Proc. Nati. Acad. Sci. USA 85: 865-869

Wevelsiep L., Kogel L. H., and Knogge W. (1991)

Purification and characterization of peptides from *Rhynchosporium secalis*

inducing necrosis in barley
Physiol. Mol. Plant. pathol.: 39 471-482

生越 明 (1976)

Rhizoctonia solani Kuhnの菌糸融合による類別と完全時代に関する研究
農技研報 C30: 1-63

桂 幸二 (1997)

博士論文

小林隆 (1991)

修士論文

百町満朗, 本間善久, 宇井格男 (1983b)

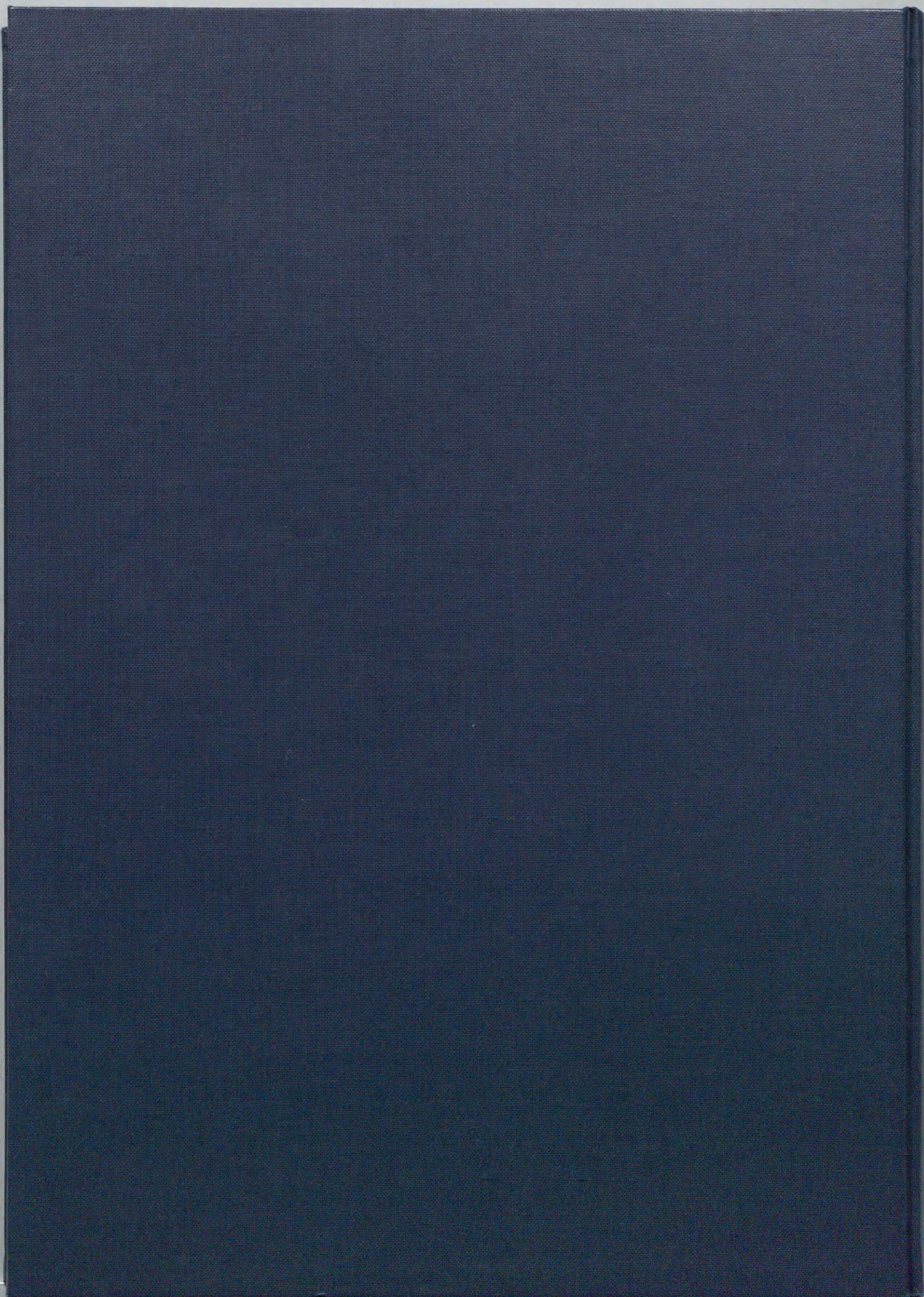
*Rhizoctonia solani*菌糸融合群第4群の異常株の性質Ⅱ 菌株間の干渉作用
日植病報 49: 374-375 (講要)

百町満朗, 本間善久, 宇井格男 (1983a)

*Rhizoctonia solani*菌糸融合群第4群の異常株の性質 日植病報 49: 120-121 (講要)

宮坂 篤 (1996)

博士論文

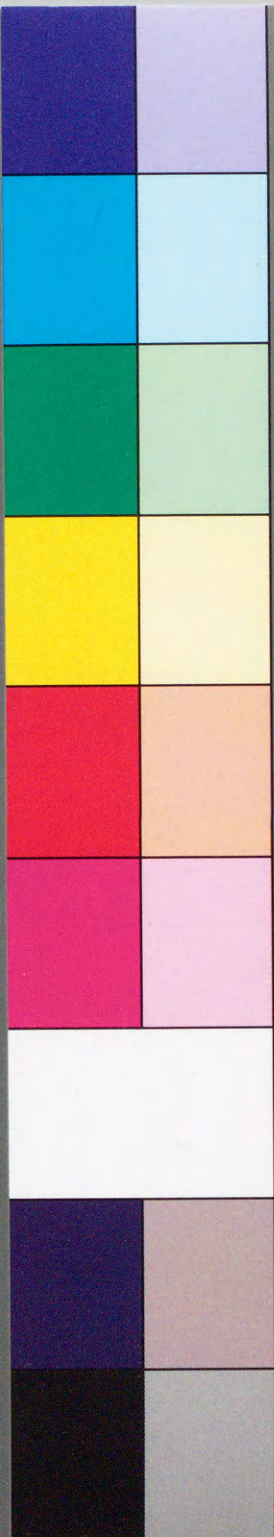


inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

